

ARBEITSBERICHT

Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in
Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*)
unter Freilandbedingungen

Arbeitsbericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

Nr. 2002/3



**Bundesforschungsanstalt
für Forst- und Holzwirtschaft**

Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung
Sieker Landstr. 2
D-22927 Großhansdorf

Abschlussbericht

zum

Forschungsvorhaben 0311387:

**Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in
Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*)
unter Freilandbedingungen**

für den Zeitraum

01.06. 1997 bis 31.05.2001

verfasst von:

Matthias Fladung

Einleitung

Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene in Bäumen sind bisher nur im Gewächshaus und noch nicht im Freiland durchgeführt worden. Da Bäume durch sehr lange Vegetationszeiten charakterisiert sind und über ausgedehnte vegetative Phasen verfügen und somit im Freiland wechselnden Witterungsbedingungen ausgesetzt sind, muss gewährleistet sein, dass spezielle gewünschte Merkmale, die mit gentechnischen Methoden auf Bäume übertragen wurden, über einen langen Zeitraum genetisch stabil und funktionsbereit bleiben.

Einem Antrag der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, vertreten durch das Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, vom 24. November 1995 auf Genehmigung einer Freisetzung (Freilandversuch) mit gentechnisch veränderten Aspen in den Jahren 1996 bis 2001 wurde mit Bescheid vom 28. Mai 1996 stattgegeben. Somit konnte auf der institutseigenen Versuchsfläche an der Sieker Landstr. 2, Gemarkung Schmalenbek, Schleswig-Holstein, Flur 8348A, Flurstück 2115, mit dem ersten Freisetzungsvorhaben mit gentechnisch veränderten Bäumen in Deutschland begonnen werden.

Im Rahmen der Untersuchungen der vom BMBF geförderten, freisetzungsbegleitenden Forschungsvorhaben „Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen“ sowie „Mykorrhiza transgener Aspen“ wurden bisher eine Vielzahl von Ergebnissen erhalten, die zusammengefasst in diesem Bericht beschrieben werden.

Im Teilprojekt „Genstabilität“ sollen der Verbleib der fremden Gene (Transgene) im Genom der Bäume sowie die molekularen Grundlagen für stabile bzw. instabile Expression der Transgene untersucht werden. Ergebnisse von phänotypischen Merkmalen wie Pflanzenhöhe oder Stammdurchmesser liegen nun insgesamt von sechs Erhebungen vor. Ebenfalls wurden umfangreiche Blattmessungen durchgeführt, die inzwischen ausgewertet wurden. Die Sequenzanalysen des Transgen-Insertionsorts sowie flankierender Regionen der transgenen Linien auf der Freisetzungsfeldfläche wurde fortgeführt. Jedoch hat sich herausgestellt, dass die aus der Freisetzung zur Verfügung stehenden Linien nicht ausreichen. Daher wurden die Untersuchungen auf weitere sowohl als bisher stabil eingestuftes transgenen als auch von instabilen Aspenlinien, die bisher nur im Gewächshaus kultiviert wurden,

ausgedehnt. Es wurde damit begonnen, molekulare Grundlagen zu erarbeiten, die es erlauben, mögliche Instabilitäten in einem Frühselektionstest unmittelbar nach der Transformation und Regeneration von transgenen Linien festzustellen. Weiterhin wurde ein Beitrag dazu geleistet, den Mechanismus der Transgen-Integration in Aspen zu verstehen. Einige instabile Linien wurden detailliert untersucht, um weitere Hinweise auf die Ursachen der Geninaktivierung in Bäumen zu erhalten.

Im Teilprojekt „Mykorrhiza transgener Aspen“ (F. Buscot, M. Kaldorf, s. anhängender Bericht) wurde der Mykorrhizastatus der Pflanzen bestimmt sowie begonnen, Bedingungen für einen möglichen horizontalen Gentransfer auf Mykorrhizapilze zu erarbeiten. Mit den Arbeiten zum Mykorrhizastatus soll untersucht werden, ob Unterschiede im Mykorrhizierungsgrad sowie in der Diversität und Vitalität der Mykorrhizen von transgenen Aspen und Kontrollpflanzen auftreten. Die Ergebnisse belegen eindeutig, dass zwischen transgenen und nicht-transgenen Aspenlinien die Unterschiede im Mykorrhizastatus gering sind. Gleichzeitig konnte beim Vergleich von transgenen Linien, die ein gleiches Genkonstrukt beinhalten, gezeigt werden, dass unterschiedliche Mykorrhizamuster durch einen Positionseffekt erklärt werden können.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial und Versuchsdesign

Als Ausgangsmaterial wurden drei Klone von Aspen (*Populus tremula* L.; Klone Brauna11 und W52) und Hybrid Aspen (*P. tremula* x *P. tremuloides* Michx.; Klon Esch5) ausgewählt (s.a. Fladung und Ahuja 1996). Für die Herstellung der transgenen Pflanzen wurden zwei Konstrukte (35S-*rolC* und *rbcS-rolC*) verwendet (Tabelle 1). Von den entstandenen unabhängigen Transformanten wurden acht für die geplante Freisetzung ausgewählt, die jeweils eine Kopie des übertragenen Konstrukts trugen. Die Transformanten wurden *in vitro* vermehrt, so dass von jeder transgenen Linie mindestens 32 transgene Pflanzen erhalten wurden. Die transgenen Klone, die für die Freisetzung verwendet wurden, werden wie folgt benannt: Esch5:35S-*rolC*#1, -#3, -#5, -#16 = E2-1, E2-3, E2-5, E2-16; Esch5:*rbcS-rolC*#4, -#18 = E14-4, E14-18; Brauna11:35S-*rolC*#2 = B2-2; W52:35S-*rolC*#2 = W2-2.

Tabelle 1: Übersicht über die für die Freisetzung verwendeten transgenen Linien

Ausgangsklon und Geschlecht		Transgene Linien	Konstrukt
Esch5	Hybridaspes, weiblich	E2-1, E2-3, E2-5, E2-16	35S- <i>rolC</i>
Brauna11	Aspe, weiblich	B2-2	35S- <i>rolC</i>
W52	Aspe, männlich	W2-2	35S- <i>rolC</i>
Esch5	Hybridaspes, weiblich	E14-4, E14-18	<i>rbcS-rolC</i>

Andere 35S-*rolC* transgene Linien aus dem Gewächshaus, die sowohl eine stabile Expression als auch morphologische Reversionen zeigten, wurden in die Untersuchungen mit eingeschlossen, um ein umfassenderes Bild über die Ursachen des Phänomens des „Gene silencing“ in Aspen zu erhalten. Schließlich wurden auch transgene Aspen mit in die Untersuchungen aufgenommen, die mit anderen Genkonstrukten (*rbcS-rolC*, 35S-*iaaL*, *proC-rolC*, 35S-*uidA* und 35S-*Ac-iaaL*) transformiert wurden. Bei diesen transgenen Aspen kann die Wirkung der Gene nicht über morphologische Bonituren erfasst werden.

Analyse der transgenen Pflanzen

Da die übertragenen Konstrukte verschiedene Merkmale der transgenen Pflanzen mehr oder weniger stark beeinflussen, können morphologische Abweichungen und deren Variation vom Wildtyp-Charakter (Kontrollklone) Hinweise auf die Expression und Stabilität der Konstrukte geben. Eine phänotypische Analyse der transgenen Pflanzen auf dem Feld wurde daher durchgeführt und dokumentiert, um eventuelle Instabilitäten sicher bonitieren zu können. Andere Merkmale werden ebenfalls erhoben: Austrieb, Höhe, Durchmesser, Blattgröße, Wachstumsabschluss und Blattverfärbung (s.a. Fladung et al. 1996).

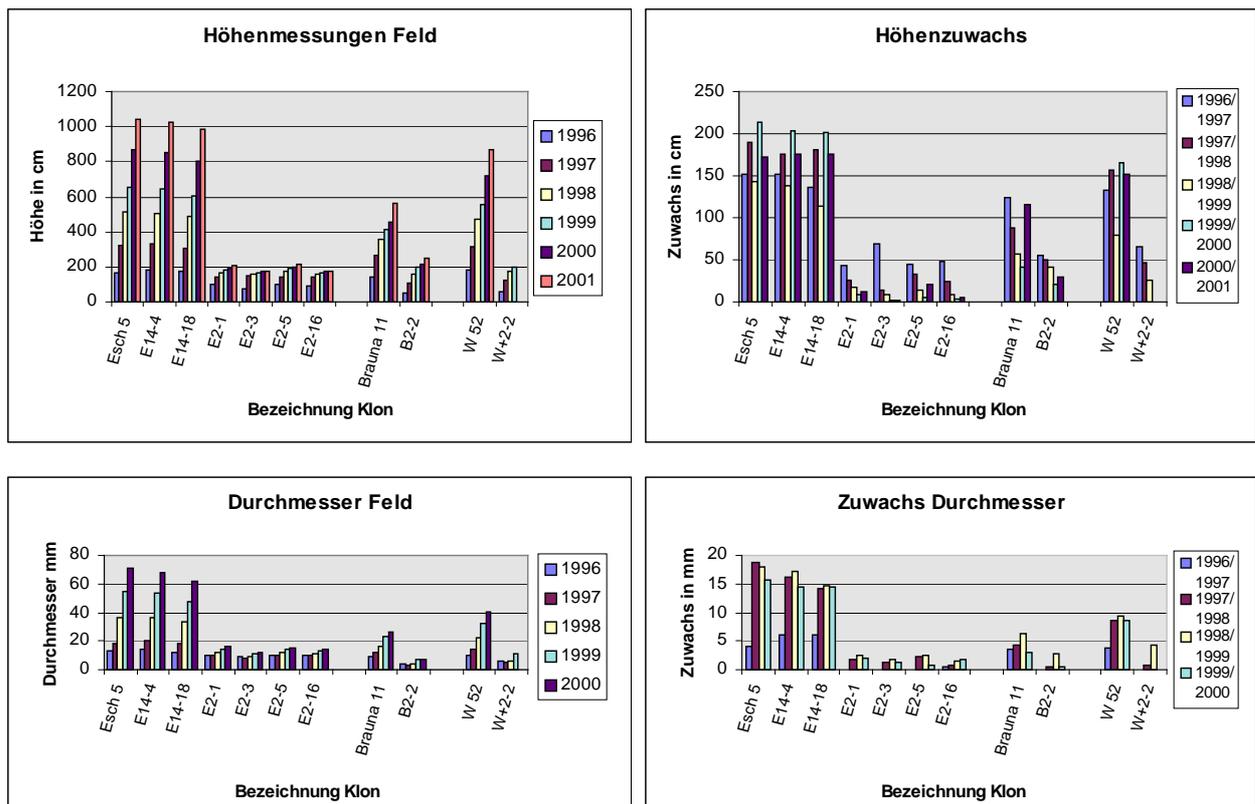
Die Linien, die morphologische Abweichungen auf der Freisetzungsfläche aufweisen, sowie die Linien aus dem Gewächshaus wurden mit molekularen Methoden (Inverse- und/oder TAIL-PCR, Sequenzierung) untersucht. Die Anzahl der integrierten Kopien von *rolC* können jederzeit entweder im Southern-Experiment oder mittels Inverse-PCR-Technik bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Pflanzenhöhe, Stammdurchmesser und weitere Merkmale

Messungen der Pflanzenhöhe (Abb. 1A) und des Stammdurchmessers (Abb. 1B) wurden in den Jahren 1997 bis 2001 durchgeführt. Wie in den vergangenen Jahren bereits gefunden, sind deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollklonen (Esch5, Brauna11, W52) einerseits und den 35S-*ro/C* transgenen Pflanzen andererseits erkennbar. Dagegen sind *rbcS-ro/C* transgene Pflanzen in der Größe von dem Kontrollklon Esch5 nicht zu unterscheiden. Der in den bisherigen Zwischenberichten bemerkte Unterschied in den Höhenzuwachsrate zwischen Kontroll- und 35S-*ro/C* transgenen Klonen hat sich weiter verstärkt. Ebenfalls hat sich der bereits festgestellte Trend bei den Zuwachsrate im Stammdurchmesser manifestiert.

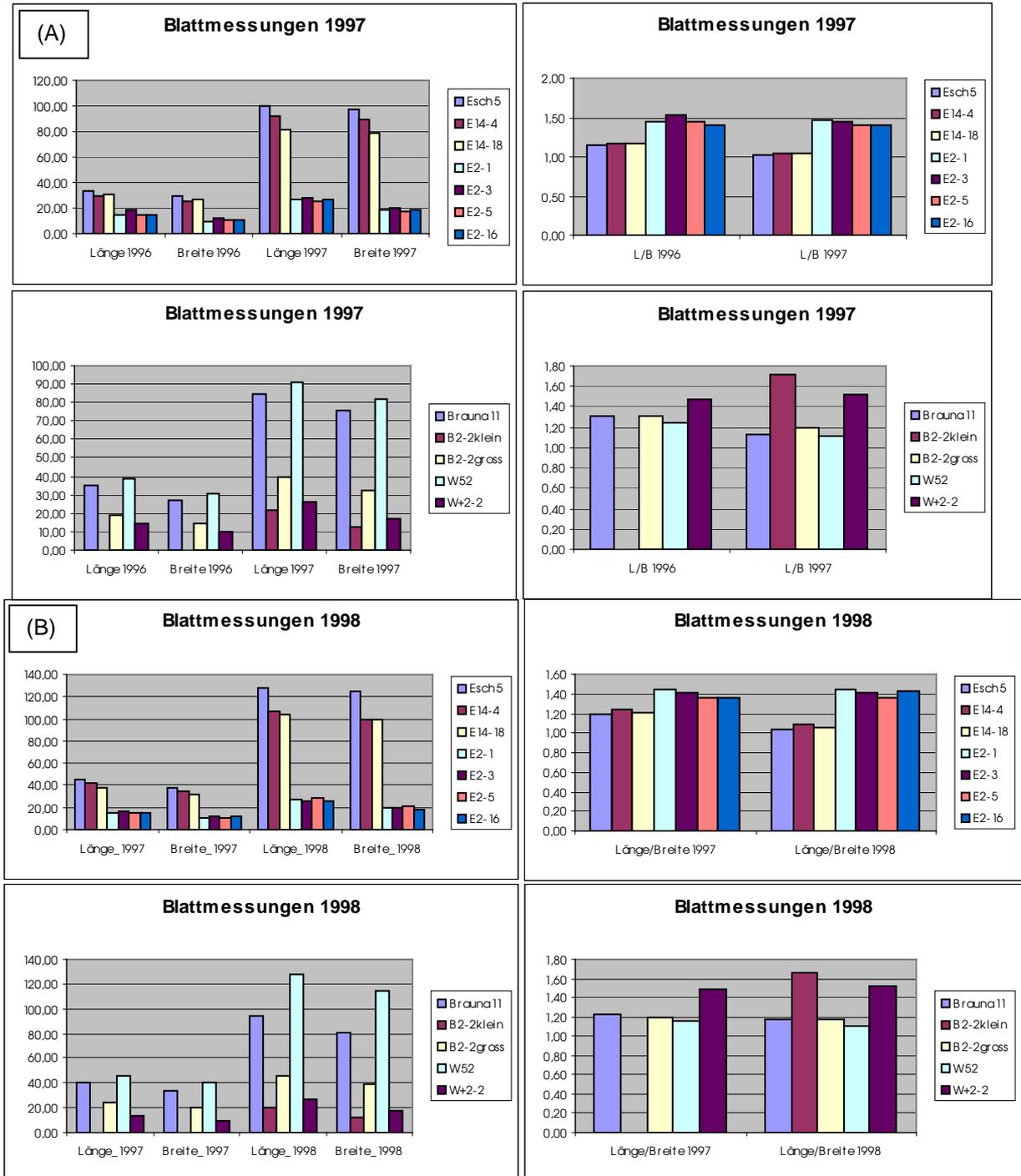
Abb. 1: Höhenmessungen und Stammdurchmesser in 10 cm Höhe von 1997 bis 2001



Bonituren des Austriebs von Blättern und Kurztrieben aus den Ruheknospen wurden wie für die vorherigen Jahre auch für 2000 durchgeführt. Wieder konnten die in den bisherigen Zwischenberichten beschriebenen Unterschiede zwischen den Klonen

beobachtet und somit bestätigt werden. Blattmessungen (Länge/Breite) wurden in 1997 und 1998 durchgeführt (Abb. 2).

Abb. 2: Messungen der Länge und Breite von Blättern von jeweiligen neugebildeten - und einjährigen Trieben sowie deren Verhältnis in 1997 (A) und 1998 (B).



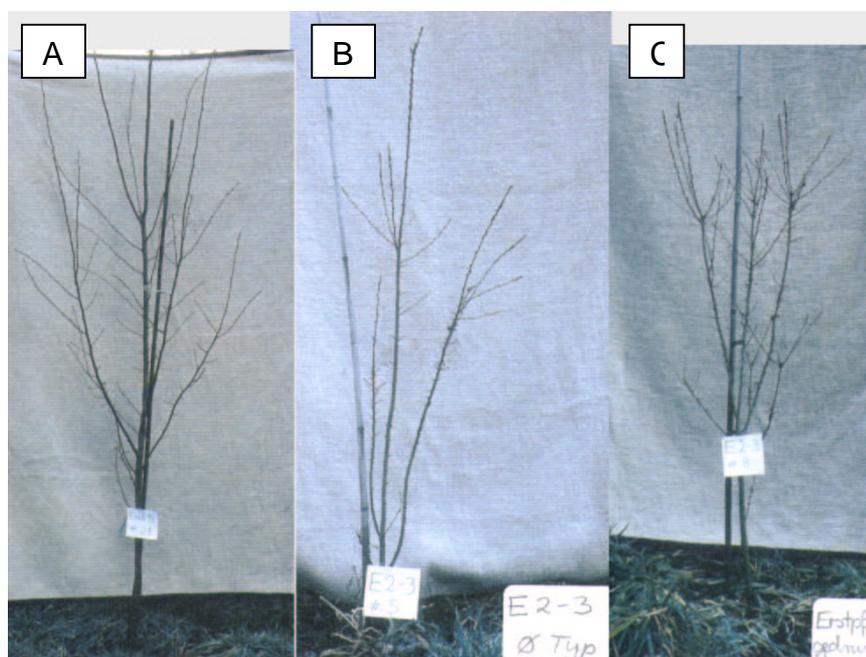
Tab. 2: Standardfehler (S.E.) der Ergebnisse aus Abb. 2.

	Länge 1996	Breite 1996	Länge 1997	Breite 1997
Esch5	0,83	0,48	1,84	2,13
E14-4	0,76	0,54	2,10	2,38
E14-18	0,65	0,50	1,98	2,24
E2-1	0,23	0,18	1,06	0,87
E2-3	0,86	0,55	1,29	0,87
E2-5	0,33	0,29	1,04	0,85
E2-16	0,33	0,27	1,36	1,12
Brauna11	0,72	0,61	2,78	2,80
B2-2klein	-	-	1,30	0,91
B2-2gross	2,32	2,14	2,44	2,00
W52	0,94	0,72	2,95	2,81
W2-2	-	-	0,99	0,64
	Länge 1997	Breite 1997	Länge 1998	Breite 1998
Esch5	0,66	0,53	2,68	3,46
E14-4	0,57	0,41	2,68	3,24
E14-18	0,53	0,41	1,77	2,12
E2-1	0,25	0,19	1,13	0,85
E2-3	1,15	1,03	4,15	4,52
E2-5	0,23	0,23	1,19	0,92
E2-16	0,28	0,32	0,93	0,77
Brauna11	0,98	0,78	3,38	3,14
B2-2klein	-	-	2,78	2,14
B2-2gross	1,16	0,86	2,29	2,24
W52	1,67	1,35	5,80	4,79
W2-2	0,99	0,94	0,98	0,79

Bonituren zur Blattverfärbung und zum Wachstumsabschluss erfolgten in 1997 und 1999. Die Ergebnisse sind sehr uneinheitlich und somit schwierig auszuwerten. Zur Blattverfärbung wurden Blätter vom in dem jeweiligen Jahr neugebildeten Spross sowie von dem aus dem Jahr zuvor bonitiert. Unterschiede konnten zwischen den 35S-*rolC* transgenen und den nicht-transgenen Kontrollen gefunden werden. Bei den Blättern vom vorjährigen Spross zeigte es sich, dass bei den nicht-transgenen Kontrollen die Blätter weniger verfärbt waren als bei den 35S-*rolC* transgenen Pflanzen, während es bei den Blättern am neugebildeten Spross genau umgekehrt war. Dieses Ergebnis weist auf eine frühere Seneszenz bei den Blättern der 35S-*rolC* transgenen Pflanzen am vorjährigen Spross sowie bei den Blättern der nicht-transgenen Kontrollen am neugebildeten Spross hin. Interessanterweise wurde festgestellt, dass die Pflanzen der 35S-*rolC* transgenen Linien verglichen mit den nicht-transgenen Kontrollen eine verzögerte Ausbildung der Abschluss-Endknospe zeigten.

Für eine phänotypische Charakterisierung der transgenen Pflanzen unter Freilandbedingungen wurden im Januar 1998 verschiedene Kontroll- und transgene Pflanzen photographisch dokumentiert. Obwohl allgemein die Wuchsform nicht immer einheitlich war, konnte nicht festgestellt werden, dass die 35S-*roIC* transgenen Pflanzen einen höheren Verzweigungsgrad als für die nicht-transgenen Kontrollen aufweisen (Abb. 3).

Abb. 3: Wuchsform von Esch5 (A) und zwei 35S-*roIC* transgenen Pflanzen der Linie E2-3 (B, C)



Morphologische und phänotypisch sichtbare Reversionen

Bonituren zu möglichen Reversionen von Pflanzen wurden mehrmals im Jahr über den gesamten Versuchszeitraum durchgeführt. Im Freiland wurden nur bei den Klonen E2-1 und B2-2 Reversionen festgestellt. Wie bereits in den Zwischenberichten ausgeführt, stellen die beobachteten Veränderungen bei Pflanzen der Linie E2-1 Reversionen von Sprossen oder Blättern dar. Dagegen betreffen die Veränderungen bei den Pflanzen der Linie B2-2 die gesamte Pflanze.

Dagegen wurden im Gewächshaus Reversionen auch an weiteren transgenen Linien festgestellt. Diese Reversionen betreffen wie bei B2-2 sowohl die ganze Pflanze (E2-12, W2-3) als auch wie bei E2-1 einzelne Sprosse oder Blätter (B2-5, W2-9).

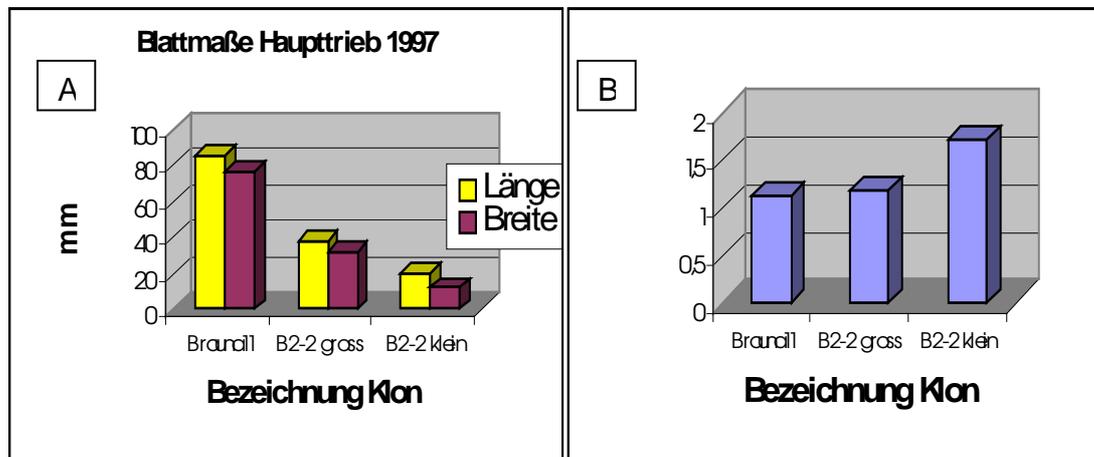
Bis zum Jahr 2001 wurden bei der Linie E2-1 Reversionen im Freiland festgestellt (Abbildung 4). Damit beträgt die Anzahl von revertierten Pflanzen acht (von 32 zu Beginn des Versuchs vorhandenen Pflanzen). Bei B2-2 wurden bis zum Jahr 1999 26 revertierte und sechs mit *ro/C*-Phänotyp gezählt. Zu Versuchsende waren von den ursprünglich sechs kleinblättrigen Pflanzen keine mehr am Leben. Ähnlich hoch war die Mortalitätsrate bei den Pflanzen der Linie W2-2, von denen zu Versuchsende nur noch drei und 2001 keine der anfänglich 32 Pflanzen lebten.

Abb. 4: Phänotypische Reversion von E2-1 bonitiert 1998



Aus Abbildung 2 wird deutlich erkennbar, dass die kleinblättrigen B2-2 Pflanzen die typischen 35S-*ro/C* Blattcharakteristika in Form von kleineren Blättern und ein höheres Längen/Breiten-Verhältnis (L/B) aufwiesen, wie sie bei den Esch5- und W52-35S-*ro/C*-transgenen Linien auch gefunden wurden. Dagegen zeigten die großblättrigen B2-2 Pflanzen ein L/B wie die Brauna11-Kontrollen, doch waren die Blätter deutlich kleiner als die von Brauna11. In Tab. 2 ist der Standardfehler der Mittelwerte aus Abbildung 2 wiedergegeben. Abbildung 5 gibt die Messwerte für B2-2 groß- und kleinblättrig im Vergleich zur nicht-transgenen Kontrolllinie Brauna11 nochmal gesondert wieder.

Abb. 5: Messungen der Längen und Breiten von jeweils 10 Blättern pro Pflanze am Haupttrieb 1997 bei Brauna11 (32 Pflanzen) und groß- (26 Pflanzen) und kleinblättrigen (6 Pflanzen) von Brauna11:35S-*roIC*



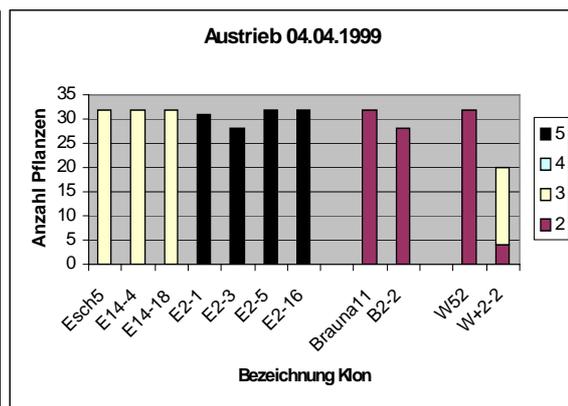
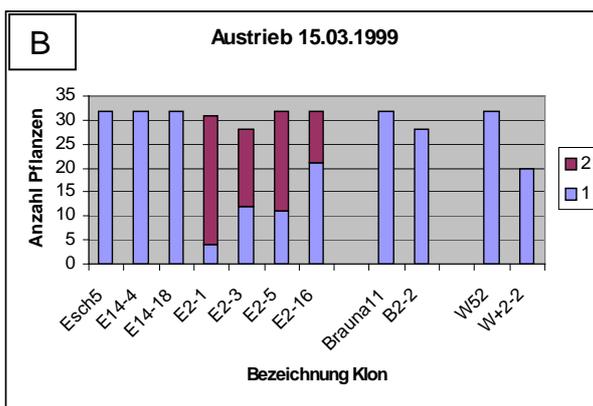
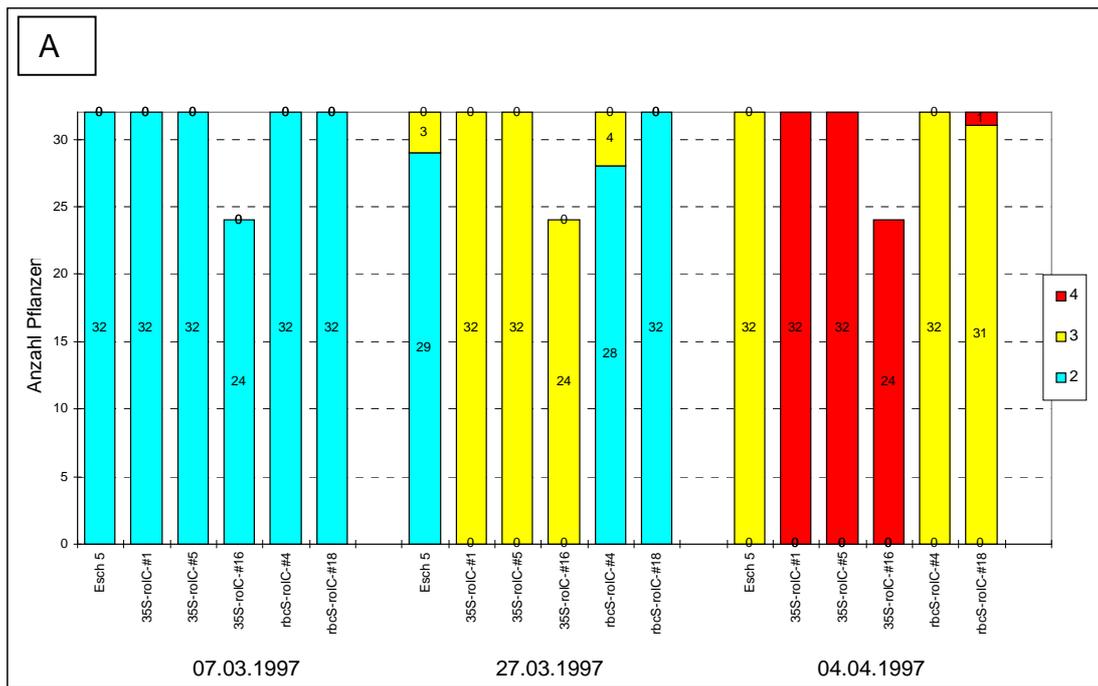
Die meisten Pflanzen der E2-transgenen Linien waren bis zum Versuchsende Oktober 2001 noch am Leben, obwohl auch bei diesen Linien eine erhöhte Mortalitätsrate festzustellen war. Darüber hinaus kann aus den Höhenmessungen abgeleitet werden, dass die Fitness der transgenen Pflanzen im Freiland niedriger als die der Kontrollpflanzen war, da die durchschnittlichen Höhenzuwachsraten der E2-transgenen Pflanzen im Gegensatz zu den der Kontrollpflanzen von Jahr zu Jahr sanken.

Für die Klone, die das *rbcS-roIC* Genkonstrukt tragen, erwies sich eine morphologische Bonitur hinsichtlich Expression von *roIC* als sehr schwierig, da die zunächst im Gewächshaus erkennbaren Unterschiede in der Blattfarbe unter Freilandbedingungen nicht mehr eindeutig feststellbar waren. Chlorophyllmessungen haben jedoch gezeigt, dass ein Unterschied im Chlorophyllgehalt zwischen Kontroll- und *rbcS-roIC* transgenen Pflanzen vorhanden ist.

Eine Erhebung des Austriebs der Pflanzen auf der Freisetzungsfäche aus den Ruheknochen wurde in den ersten drei Jahren durchgeführt. Dabei zeigte es sich, dass zwischen den nicht-transgenen Kontrollklonen Unterschiede im Austriebsverhalten festzustellen waren, wobei Esch5 deutlich vor Brauna11 und W52 austrieb. Verglichen mit den entsprechenden, nicht transgenen Kontrollen trieben die 35S-*roIC* transgenen Pflanzen, wie es bereits für Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert werden, beschrieben wurde (Fladung et al. 1997b), bis zu zwei Wochen

früher aus (Abbildung 6,). Die zeitlichen Unterschiede im Austrieb zwischen Kontrollen und 35S-*ro/C* transgenen Pflanzen zwischen den Jahren variieren stark mit den jeweiligen Witterungsbedingungen.

Abb. 6: Verlauf des Austriebs aus Ruheknospen bei Esch5 (Kontrolle), *rbcS-ro/C* und 35S-*ro/C* transgenen Zitterpappeln im Freiland 1997 (A) und 1999 (B). Der Boniturschlüssel erstreckt sich von 1=Knospe im Ruhestand bis 5=Blätter voll entfaltet.



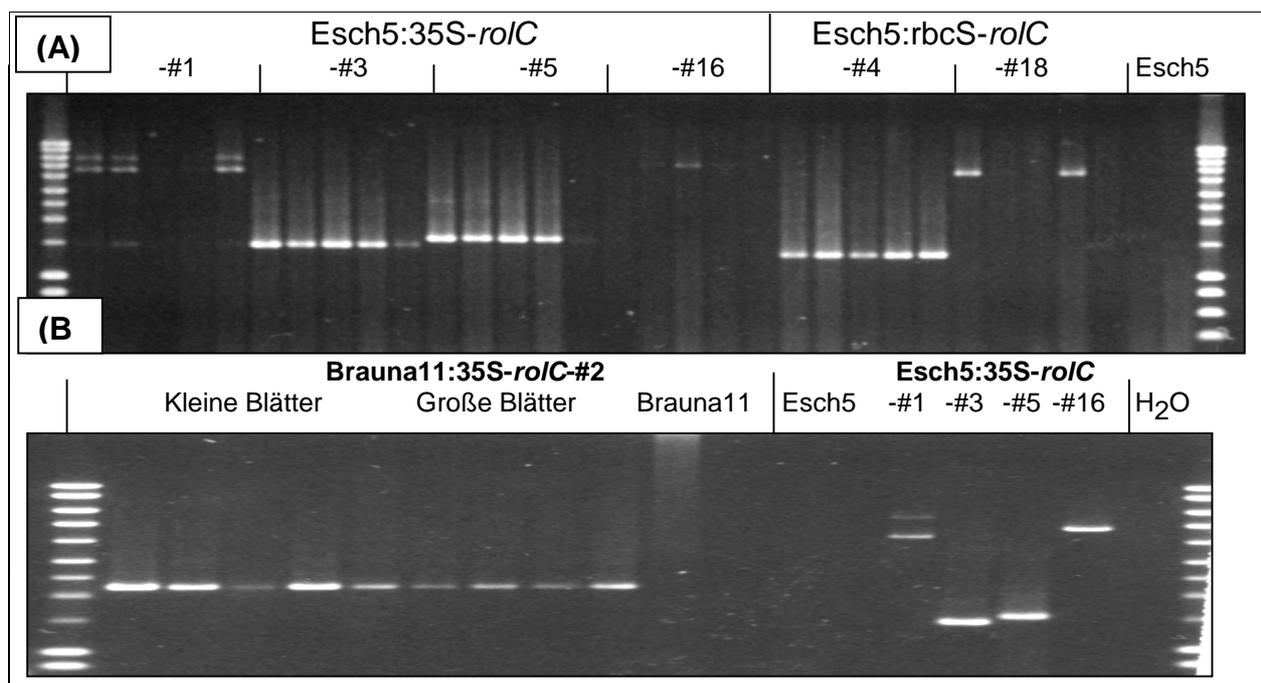
Molekulare Untersuchungen der transgenen Linien

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten unter Feldbedingungen instabilen Linien E2-1 und B2-2 wurden die übrigen 35S-*roIC*-transgenen Linien, die über die Versuchsdauer von fünf Jahren und vier Monaten unter Freilandbedingungen keine Reversionen zeigten, als „stabil“ eingestuft: Esch5:35S-*roIC*#3 (E2-3), Esch5:35S-*roIC*#5 (E2-5), Esch5:35S-*roIC*#16 (E2-16), W52:35S-*roIC*#2 (W2-2). Molekulare Analysen sollten Aufschluss darüber geben, wie der Transgen-Integrationsort sowie die flankierenden genomischen Regionen bei den Linien von der Freisetzung als auch weiterer, im Gewächshaus kultivierter Linien, die ebenfalls als stabil bzw. instabil eingestuft wurden, strukturiert sind.

Bestimmung der Kopienzahl

Die Anzahl der im Genom der transgenen Aspen integrierten Kopien des *roIC*-Gens wurde mit Hilfe von Southern-Analysen und der Inverse-PCR-Technik überprüft. In allen bisher untersuchten transgenen Pflanzen der verschiedenen Linien wurde 1997

Abb. 7: PCR-Analyse von *roIC*-transgenen Aspen aus dem Freiland. A, B. Inverse-PCR bei verschiedenen *roIC*-tragenden Aspenlinien. B. Große und kleine Blätter von B2-2.



Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abb. 8 zusammengefasst. Für die bisher als stabil *ro/C*-exprimierenden Linien wurde ein einfach strukturierter Transgen-Insertionsort festgestellt. In E2-3 wurde ein fast komplette linke Border (22 Basenpaare [Bp] = -2 Bp) festgestellt, während die rechte Border nicht vorhanden ist. Die T-DNA der rechten Border ist um 5 Bp im Vergleich zur erwarteten Sequenz verkürzt. Flankierende genomische DNA-Sequenzen von 595 Bp auf der linken und 97 Bp auf der rechten Seite wurden erhalten.

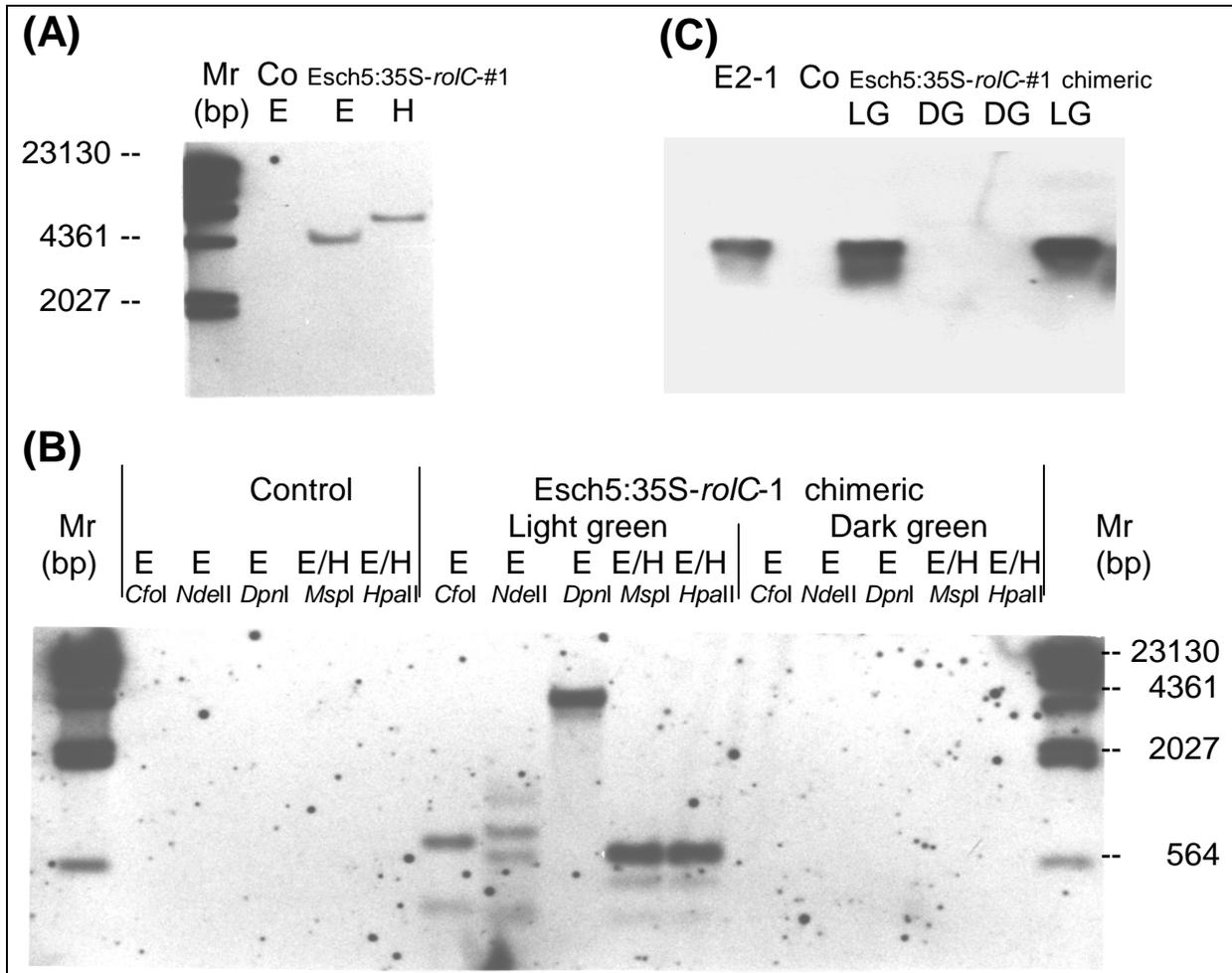
Für E2-5 wurden von der linken Border nur 15 Bp (-9 Bp) und ebenfalls keine rechte Border erhalten (Abb. 8). In dieser Linie ist an der rechten Border die T-DNA um 11 Bp verglichen zur erwarteten Sequenz verkürzt. Flankierende genomische Regionen von 492 und 318 Bp auf der linken und rechten Seite wurden erhalten. In E2-16 wurde von der linken Border 20 Bp (-4 Bp) erhalten. Die rechte Border weist die typische 3 Bp-Sequenz (TGA) auf. Auf der linken Seite wurden 319 Bp und auf der rechten Seite 413 Bp als flankierende Sequenzen gefunden.

Mit Hilfe von Primern, die aus den genomischen Sequenzen generiert wurden, war es möglich, in PCR-Reaktionen genomische Bereiche von Nicht-transgenen Kontrollen zu amplifizieren, die die Zielsequenz des Transgen-Insertionsorts repräsentieren. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen ergab, dass in E2-3 572 Bp (EMBL-Nr. AJ005757), in E2-5 19 Bp (EMBL-Nr. AJ006223) und in E2-16 51 Bp (EMBL-Nr. AJ005758) genomischer DNA nach Transgen-Integration deletiert sind. Zusätzlich wurde deutlich, dass in E2-16 von den 413 Bp flankierender DNA der rechten Border 21 Bp als Füllsequenz (Filler) anzusprechen sind, deren Herkunft unbekannt ist.

Die instabile Linie Esch5:35S-*ro/C*#1 (E2-1) aus dem Freisetzungsversuch

Die beobachteten Reversionen der Linie E2-1 umfassen sowohl eine Veränderung der Blattgröße als auch in der Blattfärbung von Hellgrün zu Dunkelgrün. Es konnte gezeigt werden, dass in Southern-Blots mit *ro/C* als Sonde hellgrüne Blätter eine Kopie des *ro/C*-Gens aufweisen (Abb. 9A, B) sowie in Northern-Untersuchungen eine *ro/C*-Expression zeigen (Abb. 9C), während in dunkelgrünen Blattteilen keine entsprechenden Signale zu finden waren (Abb. 9). Nach DNA-Restriktion und Invers-PCR-Untersuchungen wurden in hellgrünen Blättern jedoch zwei Banden gefunden

Abb. 9: Southern- (A, C) und Northern-Analysen (B) von revertierten und *roI*C-exprimierenden Seitentrieben von Pflanzen der Linie E2-1. E=*EcoRI*, H=*HindIII*, LG=Light Green (Hellgrüne-), DG=Dark Green (Dunkelgrüne Blattbereiche); *CfoI*, *NdeI*, *DpnI*, *MspI*, *HpaI* sind verschiedene Restriktionsenzyme



(Abb. 7), was auf die Anwesenheit von zwei T-DNA Kopien hinweist. Um diesen Widerspruch zu den Southern-Ergebnissen aufzulösen, wurde nicht-restringierte DNA des Klons E2-1 mit den gleichen Primern untersucht, wie sie für die Invers-PCR verwendet wurden (reverse-primer (rp)-PCR, s.S.18ff) und die Ergebnisse mit den denen der anderen Klone verglichen. Während die Klone E2-3, E2-5 und E2-16 hierbei keine Banden zeigten, war bei E2-1 eine Bande von etwa 6.5 Kb zu bemerken. Dieser Umstand deutete darauf hin, dass bei E2-1 der Transgen-Insertionsort eine T-DNA-Wiederholung (Repeat) aufweist.

Weitere Untersuchungen von hellgrünen Blättern der Linie E2-1 haben gezeigt, dass der komplex strukturierte Transgen-Insertionsort eine komplette T-DNA-Kopie und zusätzlich eine verkürzte T-DNA-Kopie von etwa 1 Kb aufweist, die sich an der linken Border befindet (Abb. 8). Die komplette T-DNA-Kopie zeigt an der linken Border 16 bp (-8 bp) und der rechten Border die typische 3 bp-Abfolge ‚TGA‘. Die verkürzte T-DNA-Kopie schließt sich an der linken Border der kompletten T-DNA-Kopie über eine 13 bp-Abfolge unbekannter Herkunft in umgekehrter Richtung (invertiert) an. Vom *npt-II*-Gen sind 696 bp erhalten, vom nos-Promotor 320, während die rechte Border des invertierten Fragments fehlt (-34 bp). Das bedeutet, dass der Transgen-Insertionsort von E2-1 von zwei rechten Borderregionen begrenzt wird. Das Fehlen des *roIC*-Gens in der verkürzten Wiederholung ist somit der Grund dafür, dass in Southern-Untersuchungen nur eine Bande gefunden wurde, da als Sonde ein DIG-markiertes *roIC*-Fragment verwendet wurde. Dieser Umstand macht deutlich, dass nach Southern-Untersuchungen nicht immer zuverlässig Rückschlüsse auf Vorhandensein/Abwesenheit der gesamten T-DNA möglich sind, wenn nur ein Teil der T-DNA als Sonde verwendet wird.

Im Gegensatz zu den bisher in annualen Pflanzen berichteten Ergebnissen zur transkriptionellen oder post-transkriptionellen Inaktivierung von gentechnisch übertragenen Genen, zeigten die revertierten Bereiche von Pflanzen der Linie E2-1 kein *roIC*-spezifisches Signal in Southern- und Northern-Untersuchungen. Es kann angenommen werden, dass sich der Verlust des Konstrukts, der bei dieser Linie beobachtet wurde, während des vegetativen Wachstums ereignet.

Mögliche Gründe des Verlusts der T-DNA lassen sich aus der komplexen Struktur des Transgen-Insertionsorts der Linie E2-1 ableiten. In verschiedenen Veröffentlichungen ist beschrieben worden, dass ungewöhnliche T-DNA flankierende Regionen wie AT-reiche Sequenzen und/oder repetitive Sequenzen, Telomer-Wiederholungen oder Retrotransposons zu einer Deletion von Transgenen führen können (z.B. Heberle-Bors et al. 1988, Takano et al. 1997). Jedoch finden sich in E2-1 keinerlei Hinweise auf derartige Strukturen in den der T-DNA flankierenden Regionen.

Vielmehr scheint eine intrachromosomale Rekombination für den Verlust der T-DNA in E2-1 verantwortlich zu sein. Homologe Bereiche von nur wenigen Nukleotiden können für eine homologe Rekombination ausreichend zu sein, was zum Verlust des Transgens führen kann (Risseeuw et al. 1997). In E2-1 liegt ein invertierter, 1050 Bp

großer Bereich vor, der eine 100%-ige Homologie zum *npt*-Gen und zum nos-Promotor zeigt. Während der Mitose kann es passieren, dass durch intrachromosomale Basenpaarung ein bis zu 1050 Bp langer doppelsträngiger DNA-Bereich entsteht. Eine Replikation dieser doppelsträngigen DNA ist nicht möglich, da in dieser Region das für die Replikation essentielle ‚Einzelstrang-bindende-Protein‘ nicht binden kann.

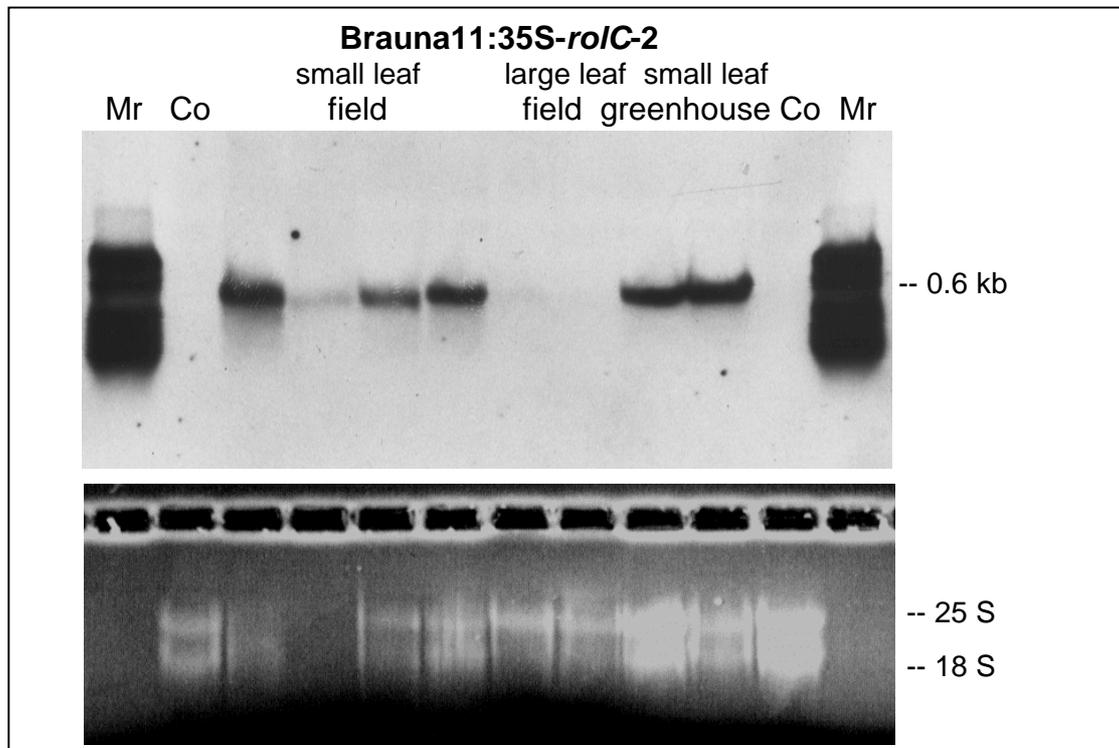
Die instabile Linie Brauna11:35S-roIC#2 (B2-2) aus dem Freisetzungsversuch

Wie bereits beschrieben, wurden in allen Pflanzen der Linie B2-2, die sowohl große als auch kleine Blätter aufwiesen, in PCR-Analysen unter Verwendung spezifischer Primer die Amplifikationsprodukte, die eine Anwesenheit des *roIC*-Gens anzeigen, gefunden. Auch wurden nach Inverse-PCR-Untersuchungen Banden gleicher Größe detektiert, was auf einen gleichen Insertionsort der T-DNA hinweist und somit derselben transgenen Linie angehören.

In Northern-Experimenten wurde nach einem *roIC*-spezifischen Transkript in großen und kleinen Blättern von Pflanzen der Linie B2-2 gesucht. Dazu wurden kleinblättrige Pflanzen sowohl von der Freisetzungsfläche als auch vom Gewächshaus sowie die großblättrigen Pflanzen von der Fläche untersucht. Es konnte eindeutig ein *roIC*-spezifisches Signal in den kleinen Blättern nachgewiesen werden, während die großen Blätter nur eine sehr schwache *roIC*-spezifische Hybridisierung zeigten (Abb. 10). Nicht-transgene Kontrollpflanzen zeigten kein Signal.

Eine Analyse des Transgen-Insertionsorts von B2-2 erbrachte das überraschende Ergebnis, dass an dem einem identifizierten Integrationsort keine Transgen-Wiederholung vorliegt. Auch waren die Analysen zur Methylierung des Promotors und/oder Gens negativ. Die Sequenzierung der rechten und linken Bereiche der T-DNA zeigte, dass die Verteilung der Nukleotide keine auffälligen Bereiche wie AT-reiche Regionen ($\geq 85\%$ AT-Gehalt) aufweist. Dagegen konnte nach Sequenzierung von über 1700 Bp der T-DNA-flankierenden Region eine 80%-ige Homologie zu einem putativen Methyltransferase Gen aus *Arabidopsis* gefunden werden (Blastx E-value $9e-35$).

Abb. 10: Northern (A) von Pflanzen mit kleinen und großen Blättern der Linie B2-2. In (B) ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel vor dem Blot zu sehen. Co=Nicht transgene Brauna11



Linien in der *In-vitro* Kultur und im Gewächshaus

Da im Rahmen der Freisetzung transgener Aspen nur eine geringe Anzahl von 35S-*roIC* transgenen Linien getestet werden konnten, wurde für die molekularen Untersuchungen von *roIC*-stabil- bzw. -instabil exprimierenden Linien auf andere 35S-*roIC*-Linien zurückgegriffen, die im Gewächshaus bzw. in Gewebekultur kultiviert werden. Mit Hilfe einer einfach zu handhabenden Methode, die wir reverse-primer (rp) PCR genannt haben, war es leicht möglich, weitere 35S-*roIC*-stabil bzw. instabil exprimierende, transgene Linien hinsichtlich der Struktur ihres T-DNA-Integrationsorts zu untersuchen (Abb. 11). Auch konnten eine Reihe weiterer transgener Linien, die mit anderen Genkonstrukten wie 35S-*iaaL*, 35S-*Ac-iaaL*, 35S-*Ac-roIC* transformiert wurden, in die Untersuchungen mit eingeschlossen werden.

Abb. 11: (A-C) Lokalisation der Primer in der T-DNA und (D) Anwendung verschiedener Primer-Kombinationen zur Bestimmung von T-DNA Repeats in transgenen Pflanzen mit Hilfe der rpPCR (Details s. Kumar und Fladung 2000a).

(D)	PCR amplifications using different primer pairs					Remarks
(A) Direct repeat ^a	1+2	1+5	1+3	2+6	2+4	
	-	-	-	-	-	No T-DNA repeat
	+	+	+	+	+	Complete repeat
	+	+/-	-	+/-	-	Incomplete repeat (both copies are truncated)
	+	+	+	-	-	Incomplete repeat (on left border of left copy T-DNA)
	+	-	-	+	+	Incomplete repeat (on right border of right copy T-DNA)
	-	+ ^b	+ ^b	-	-	Incomplete repeat (on left border of right copy T-DNA)
(B) Inverted repeat ^c						
(i) Head to head	+	+	+	+	+	Amplification due to one primer (see Fig 1 C i)
(ii) Tail to tail	+	+	+	+	+	Amplification due to one primer (see Fig 1 C ii)

^a Other possible combinations are not ruled out which may be interpreted according to the PCR results obtained.

^b Band size smaller than expected.

^c The status (complete or truncated) and location of a repeat may be determined on the basis of presence or absence of bands with different primer pairs and their respective sizes as in case of direct repeat.

Die beobachteten Instabilitäten aus den Langzeitbeobachtungen während der *in-vitro* Kultur, im Gewächshaus und auf dem Feld lassen sich in verschiedene Kategorien einordnen:

Nach einer vollständigen Suppression der phänotypischen *roIC*-Expression wird in der gesamten Pflanze der Ursprungs-Wildtyp Phänotyp erkennbar („reverted“ in Tab.3). Dagegen findet man eine variable *roIC*-Expression bei Linien, die einen *roIC*-Phänotyp aufweisen, aber während der pflanzlichen Individualentwicklung Seitenzweige hervorbringen, die Wildtyp-Charakter haben („variable“ in Tab.3). Schließlich wurden auch zwei Linien identifiziert, die weder einen *roIC*- noch den Wildtyp-Phänotyp zeigen („altered“ in Tab.3).

Unter *in-vitro* Bedingungen wurde in Dauerbeobachtungsexperimenten, die über 5 bis 6 Jahre liefen, eine stabile *roIC*-Expression in allen 15 35S-*roIC* transgenen Hybrid Aspen gefunden. Dagegen zeigte es sich, dass von den 16 ursprünglich vorhandenen 35S-*roIC* transgenen reinen Aspenlinien nur 7 die Langzeit *in-vitro* Kultur überlebt haben. Von diesen Linien zeigte eine Linie bereits von Beginn an eine

Reversion zum Wildtyp-Phänotyp (W2-9), während 3 Linien eine instabile *roIC* Expression während der Langzeit *in-vitro* Kultur aufweisen.

Nach Übertragung in das Gewächshaus zeigen 2 weitere Linien eine instabile *roIC*-Expression. Dagegen ist bei einer Linie, die unter *in vitro*-Kultur noch eine Instabilität der *roIC*-Expression (W2-2) gezeigt hatte, sowohl im Gewächshaus als auch auf dem Feld keine instabile *roIC*-Expression mehr festzustellen. Diese Instabilität äußert sich in der Ausbildung großer Blätter, wie sie für Kontrollpflanzen unter *in-vitro* Bedingungen ebenfalls typisch sind. Eine molekulare Analyse der Linie W2-2 ergab jedoch, dass ähnlich wie für die instabile Linie B2-2 im Feld am Transgen-Insertionsort nur eine T-DNA vorhanden ist. Ebenfalls konnte keine Methylierung des 35S-Promotors gefunden werden. Allerdings ist, wie bereits erwähnt, bei dieser Linie unter Freilandbedingungen die sehr hohe Mortalitätsrate auffallend.

Eine Übersicht über die gefunden Instabilitäten in den 35S-*roIC* transgenen Linien gibt Tab. 3. Es kann eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Transgen-Wiederholung und der Methylierung des Promotors vermutet werden. Eine Sequenzierung der T-DNA flankierenden Regionen ergab, dass in 4 Linien Bereiche vorhanden sind, die einen auffallend hohen AT-Gehalt ($\geq 85\%$) aufweisen (Abb. 12). Die Sequenzen der T-DNA flankierenden Regionen mit Bereichen sehr hoher AT-Gehalten stehen in scharfen Kontrast zu den vielen erhaltenen Sequenzen anderer transgener Linien, die eine „normale“ Nukleotidverteilung und einen AT-Gehalt von 55 bis 60% aufweisen. AT-reiche Regionen sind DNA Komponenten, die Bestandteile des konstitutiven Heterochromatins darstellen und gewöhnlich in pericentromeren Regionen gefunden werden.

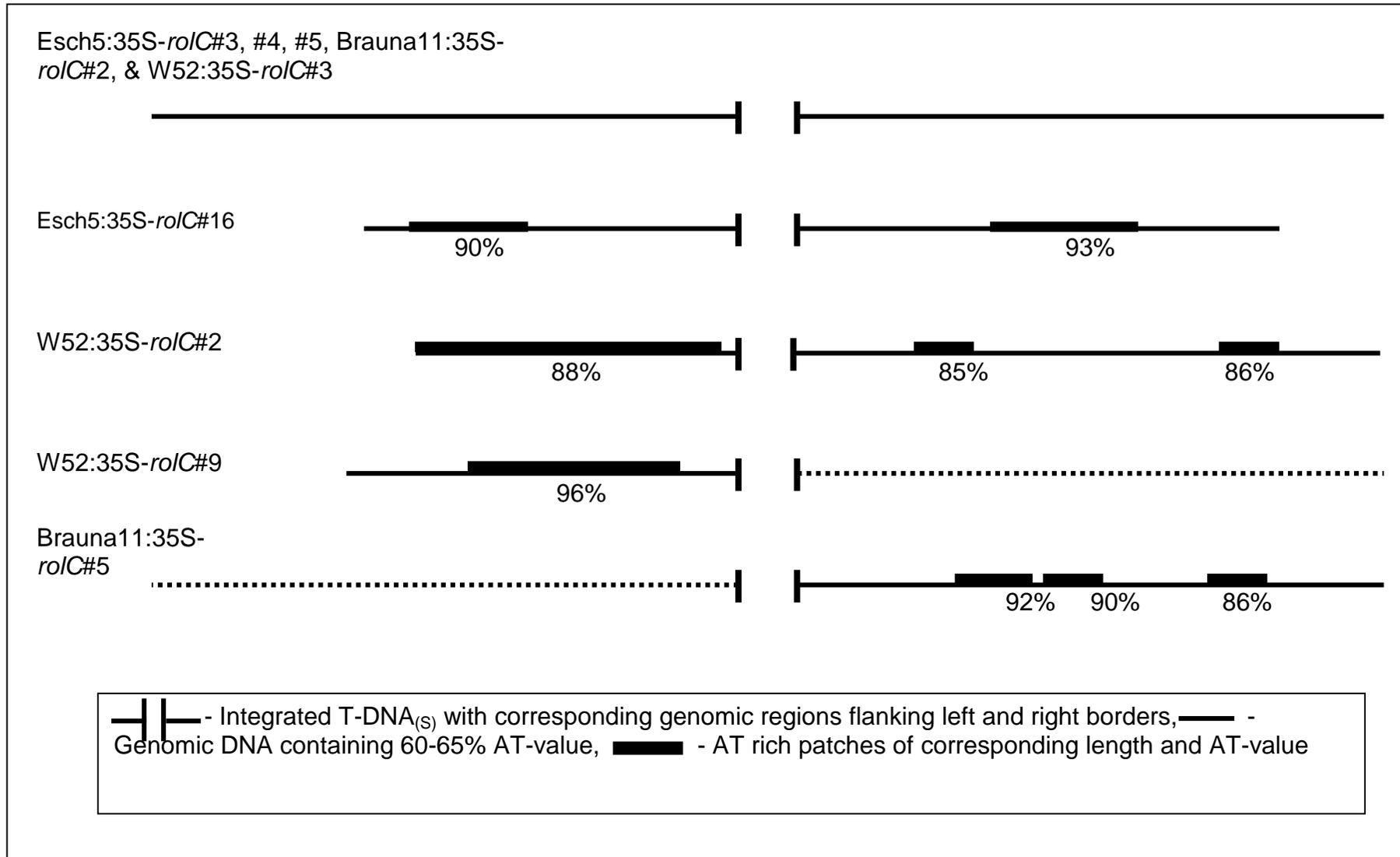
Bei drei Linien ist eine instabile Expression des 35S-*roIC* Genkonstrukts gefunden worden, während die vierte Linie (E2-16) in den Langzeituntersuchungen unter *in vitro* Bedingungen, im Gewächshaus und im Freiland noch keine instabile *roIC* Expression zeigte. Allerdings ist diese Linie unter Freilandbedingungen als einzige 35S-*roIC* transgene Hybridaspennlinie durch eine relativ hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet. Interessanterweise weist die Linie W2-2, die im Freiland ebenfalls eine hohe Mortalitätsrate zeigte, auch Bereiche mit hohen AT-Gehalten auf.

Tab. 3: *RolC*-Expression und Transgen-Struktur in verschiedenen Linien der reinen Aspe (*P. tremula*) und der Hybridaspe (*P. tremula x P. tremuloides*). Details s. Kumar and Fladung 2002.

Wild/Hybrid aspen	Transgenic line	Southern analysis ^a	T-DNA structure (Reverse primer PCR) ^b	Promoter methylation ^c	<i>RolC</i> phenotypic expression ^d
Hybrid aspen	Esch5:35S- <i>rolC</i> #3, #4, #5, & #16	One copy	No repeat	NM	<i>rolC</i> type
	Esch5:35S- <i>rolC</i> #1	One copy	Inverted repeat (one incomplete)	M	Variable
	Esch5:35S- <i>rolC</i> #2	Two copies	Direct repeat (both complete)	M	Reverted
	Esch5:35S- <i>rolC</i> #12	Two copies	Direct repeat (both complete)	M	Reverted
Wild aspen	W52:35S- <i>rolC</i> #9	One copy	Direct repeat (one incomplete)	M	Reverted
	W52:35S- <i>rolC</i> #12 ^e	Two copies	Direct repeat (both incomplete)	M	Variable
	W52:35S- <i>rolC</i> #2	One copy	No repeat	NM	Variable ^f
	W52:35S- <i>rolC</i> #3	One copy	No repeat	NM	Reverted ^g
	Brauna11:35S- <i>rolC</i> #2	One copy	No repeat	NM	Altered
	Brauna11:35S- <i>rolC</i> #5	Two copies	Inverted repeat (one incomplete)	M	Variable

^aFrom Fladung et al. 1997 (*rolC* probed); ^bKumar and Fladung 2000a; ^cCytosine methylation at the sequence CCGG (Kumar and Fladung 2000a), M-methylated, NM-not methylated; ^dVariable-*rolC* expression suppressed only in one or two branches of a plant, Reverted-*rolC* expression completely suppressed in the whole plant, Altered-incomplete *rolC* suppression in whole plant; ^eNo plant transferred to greenhouse or field; ^falteration in *rolC* expression observed in *in vitro* cultures only; ^gadditionally mutant phenotype

Abb. 12: Sequenzierungsanalyse der T-DNA-flankierenden Regionen verschiedener 35S-rolC transgener Aspenlinien.



Detaillierte Untersuchungen von drei instabilen Linien aus dem Gewächshaus

Drei der instabilen Linien, die im Gewächshaus identifiziert wurden (W2-9, E2-12, B2-5), wurden intensiver in Southern, Northern und Western-Blot Analysen untersucht. Diese Linien sind durch ihre sehr unterschiedlichen Typen der *roIC*-Inaktivierung charakterisiert. Während W2-9, wie bereits erwähnt, die einzige Linie war, die bereits unter *in-vitro* Bedingungen eine vollständige Reversion zum Wildtyp zeigte, aber dennoch auf Kanamycin-haltigen Nährböden regenerierte, war in E2-12 eine graduelle Reversion vom *roIC*-Phänotyp zum Wildtyp über drei bis vier Jahre zu beobachten. Darüber hinaus zeigte die Linie W2-9 hellgrün/dunkelgrün gecheckte Blätter. Dagegen zeigte B2-5 eine variable Reversion, die phänotypisch zwar ähnlich war wie die von E2-1, jedoch wesentlich seltener auftrat. Details dieser Untersuchungen sind in Fladung und Kumar (2002) beschrieben.

W2-9

Eine PCR-Analyse bestätigte zunächst die Anwesenheit des *roIC*-Gens in W2-9. Southern-Blot Analysen nach Restriktion mit *HindIII* oder *EcoRI* mit dem *roIC*-Gen als Sonde ergaben jeweils eine Bande von 8 kB und 4.7 kB. Beide Enzyme schneiden nur einmal in der T-DNA, so dass bei Doppelrestriktion die 35S-*roIC*-Kassette (Größe: 1.6 kB) herausgeschnitten wird. Bei W2-9 jedoch wurden nach *EcoRI* und *HindIII* Doppelrestriktion zwei Banden erhalten: eine von der erwarteten Größe von 1.6 kB und eine zusätzliche von 3.1 kB. Zunächst war in PCR-Untersuchungen festgestellt worden, dass in W2-9 zwei unvollständige Kopien vorliegen, bei denen die *HindIII* Schnittstelle fehlte. In vielen weiteren PCR-Untersuchungen mit verschiedenen Primerkombinationen stellte es sich heraus, dass zusätzlich zu der beschriebenen Situation ein weiterer Transgen-Integrationsort existiert. In diesem sind auch zwei T-DNA Kopien vorhanden, wovon die eine Kopie jedoch keine *EcoRI*-Schnittstelle zeigt. So haben wir die Hypothese aufgestellt, dass diese Linie eine „Transgen-Chimäre“ darstellt, die aus zwei verschiedenen Zelltypen besteht. Diese Hypothese wird phänotypisch durch das Vorhandensein der dunkelgrün-hellgrün gecheckten Blätter unterstützt. Es kann nicht entschieden werden, ob es sich um eine Transformation von benachbarten Einzelzellen handelt, oder ob nach der Transformation im Zuge mitotischer Teilungen genomische Rearrangements stattgefunden haben. Für die

letzte Hypothese spricht, dass beide Transgen-Integrationsorte sehr ähnliche flankierende genomische Regionen aufweisen.

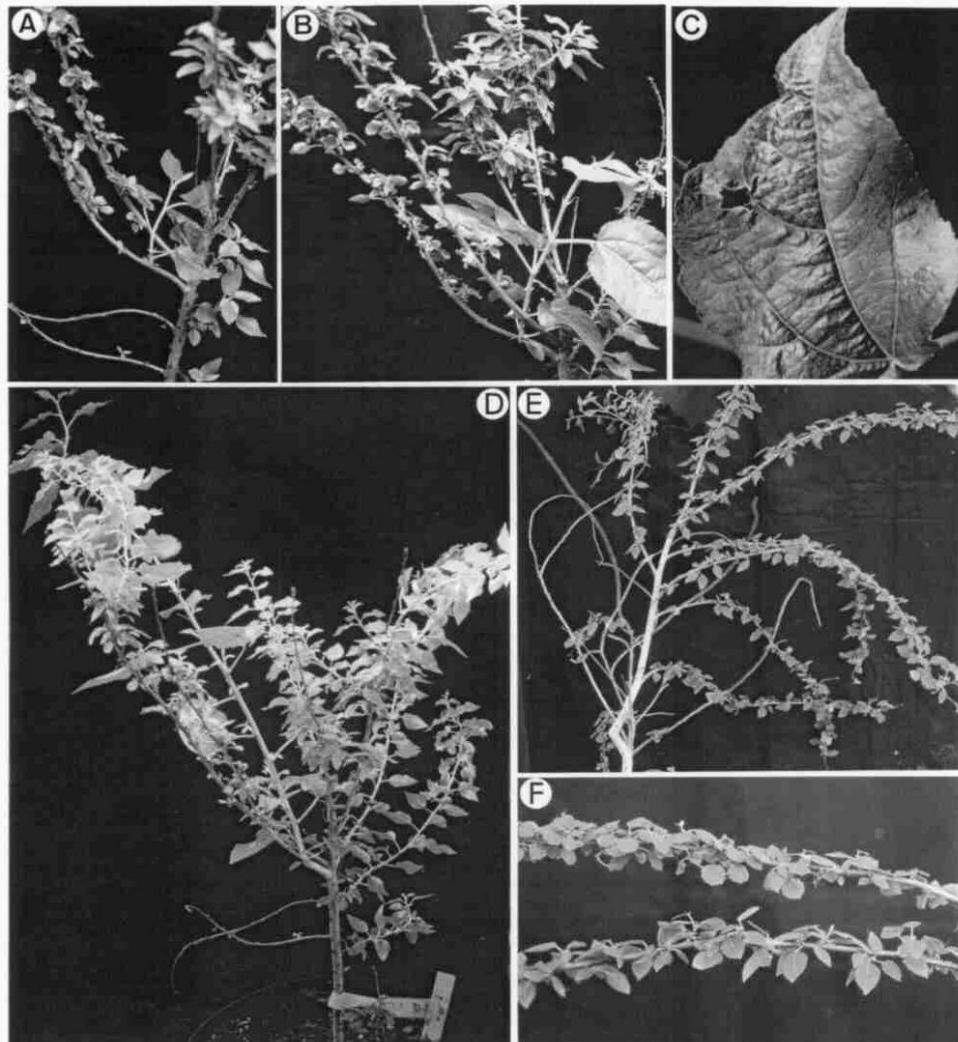
Untersuchungen zur Expression des *roIC*-Gens wurde an den hell- und dunkelgrünen Blattsegmenten durchgeführt. Bei beiden Sektorentypen fanden sich sowohl in Northern-Blot als auch in Western-Blot Analysen *roIC*-spezifische Banden. Es aber konnte nicht entschieden werden, inwieweit die beobachteten Sektoren selber bereits Mischgewebe darstellen.

B2-5

In der Linie B2-5 zeigten bereits Southern-Blot Untersuchungen mit der *roIC*-Sonde das Vorhandensein von zwei *roIC* Kopien. Der Phänotyp aller Pflanzen dieser Linie ist *roIC*. Jedoch war bei zwei Pflanzen eine variable Reversion zu beobachten, von denen eine besonders prägnant war. Im Frühjahr des Jahres 1995 wurde nach Knospenaustrieb an einer Pflanze gefunden, dass unter Hunderten gleichzeitig austreibender Knospen mit *roIC*-Trieben eine Knospe einen Trieb hervorbrachte, der Wildtyp-Charakter (lange Internodien, Vorhandensein großer Blätter) zeigte (Abb. 13). Dieser Trieb wurde während des Jahres 1995 photographisch dokumentiert und molekular untersucht. Während die *roIC*-Triebe sowohl in Northern-Blot als auch in Western-Blot *roIC*-spezifische Banden zeigten, war bei den revertierten Trieben nur im Northern-Blot ein *roIC*-spezifisches zu finden, während im Western-Blot kein entsprechendes Signal entdeckt werden konnte. Nach Blattfall im Herbst 1995 und Wiederaustrieb im Frühjahr 1996 zeigte es sich, dass derselbe Trieb, der 1995 revertiert und große Blätter aufwies, 1996 kleine Blätter ausbildete. Eine erneute molekulare Untersuchung zeigte sowohl in Northern-Blot als auch in Western-Blot das Vorhandensein *roIC*-spezifischer Banden.

Southern-Blot Untersuchungen mit *npt-II* als Sonde zeigten jedoch drei Banden. In umfangreichen PCR-Analysen mit vielen verschiedenen Primerpaaren konnte dann gezeigt werden, dass in der Linie B2-5 zwei verschiedene Transgen-Integrationsorte vorhanden sind. An dem ersten Integrationsort wurden mindestens zwei T-DNA-Kopien (eine vollständige und mindestens eine unvollständige) gefunden. Dieser Integrationsort ist auch deshalb interessant, da Evidenzen vorliegen, dass weitere T-DNA-Fragmente in diesen Integrationsort inseriert sind. In dem unabhängigen zweiten Integrationsort ist eine weitere vollständige T-DNA-Kopie lokalisiert.

Abb. 13: Reversion in B2-5. A-D: Reversion 1995. E-F: Re-Reversion in 1996. Details s. Fladung and Kumar 2002



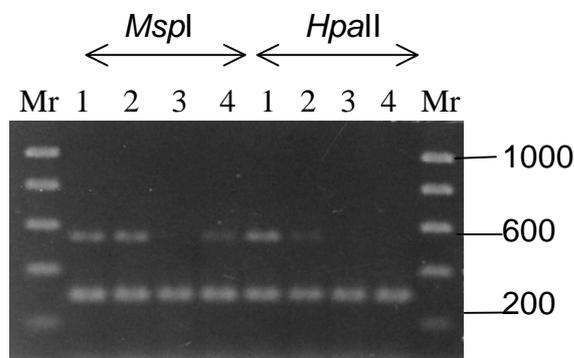
E2-12

Die dritte im Detail untersuchte Linie E2-12 zeigte eine graduelle Reversion vom *roIC*-Phänotyp zum Wildtyp über einen Zeitraum von 3 bis 4 Jahren. Diese Linie wies sowohl im Southern-Blot als auch in verschiedenen PCR-Untersuchungen zwei vollständige T-DNA-Kopien auf. Beide vollständigen T-DNA-Kopien liegen an einem Integrationsort vor. Im Northern-Blot war ein *roIC*-spezifische Bande zu sehen, während im Western-Blot kein entsprechendes Signal gefunden werden konnte.

Untersuchungen zur Methylierung vom Promotor und/oder Gen

In der Literatur wird davon berichtet, dass mit der Ausbildung von Repeats in transgenen Pflanzen auch eine C-Methylierung von Promotor und/oder Transgen in den übertragenen Konstrukte einhergeht. Um diesen Umstand an den transgenen Aspen zu überprüfen, wurde eine PCR-basierende Methode entwickelt, mit der unter Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsenzyme Hinweise auf Methylierung von Cytosin-Nukleotiden im Promotor und/oder Gen erhalten werden können. Sicherlich stellt die Methode der Sequenzierung von mit Bisulfit-behandelter DNA eine Möglichkeit dar, um quantitative Aussagen über den Methylierungsgrad von Sequenzen machen zu können, jedoch ist diese Methode sehr zeitaufwendig sowie technisch komplex und somit für Routineanalysen ungeeignet. Dagegen ist die von uns entwickelte Methode einfach durchzuführen und erlaubt Aussagen über die Methylierung, wenn nach Restriktionsverdau mit mindestens einem Enzym reproduzierbar eine PCR-Amplifikation stattgefunden hat (Abb. 14). Für alle hier genannten instabilen transgenen Linien, die eine Transgen-Wiederholung aufweisen, ist eine Methylierung der Restriktionsstellen, die von den Enzymen *MspI* und *HpaII* innerhalb des 35S-Promotors spezifisch geschnitten werden, festzustellen. Dagegen zeigt die instabile Linie, für die keine Transgen-Wiederholung nachgewiesen werden konnte, keine Methylierung.

Abb. 14: PCR-Analyse zur 35S-Promotor Methylierung. Die untere Bande ist die positive Kontrolle, während die obere Bande die Amplifikation des 35S-Promotors nach Restriktionsverdau mit den methylierungssensitiven Enzymen *MspI* und *HpaII* wiedergibt (Details s. Kumar und Fladung 2000a).



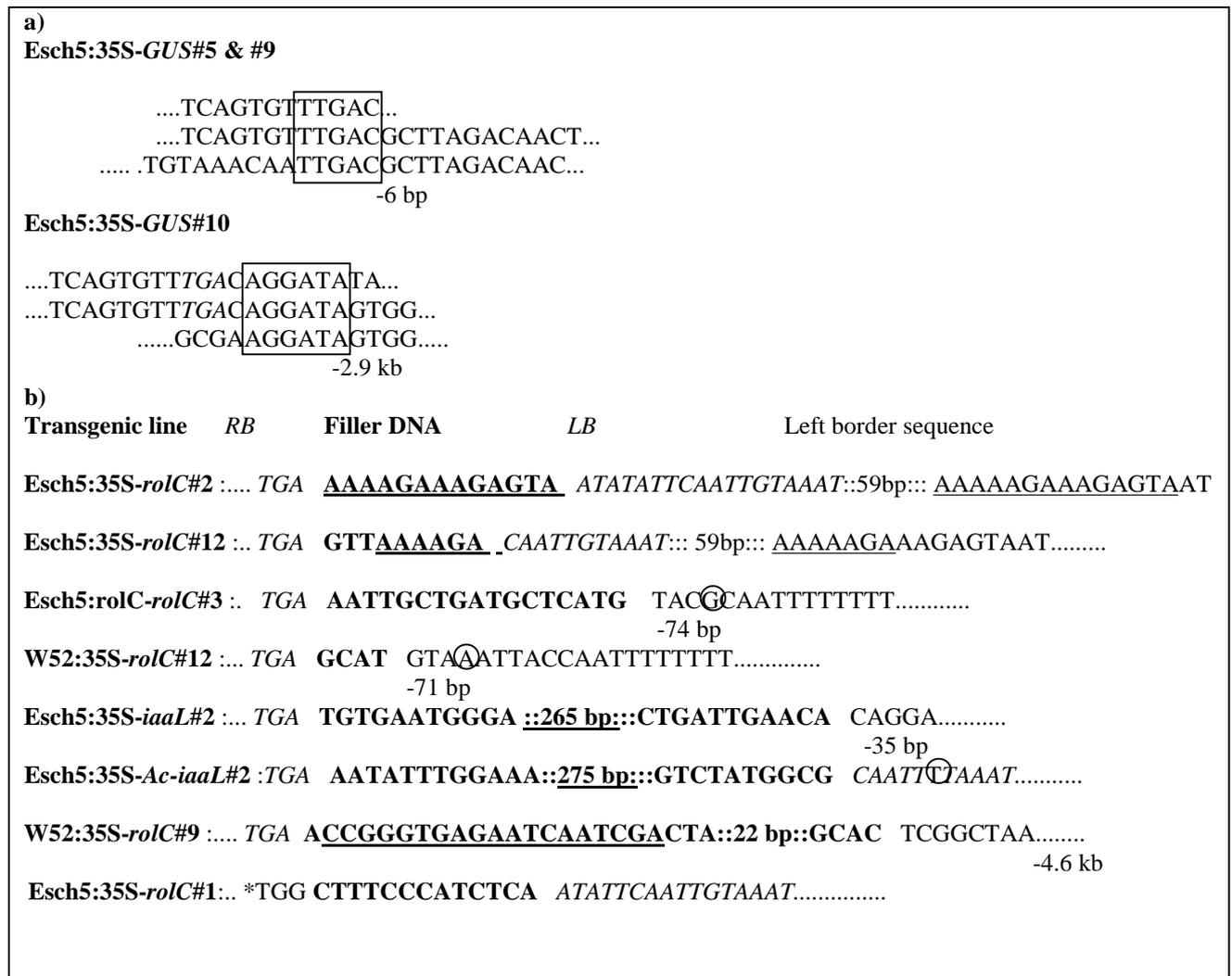
Die drei im Detail beschriebenen transgenen Aspenlinien E2-12, B2-5 und W2-9, die das 35S-*roIC* Konstrukt tragen und sehr unterschiedliche Arten einer Reversion zum Wildtyp zeigten, wurden auch hinsichtlich ihres Methylierungsmusters eingehender untersucht. Alle drei Linien zeigten eine Methylierung des 35S-Promotors und, mit Ausnahme der Linie W2-9, auch eine Methylierung des *roIC*-Gens. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, dass sowohl B2-5 als auch E2-12 zwei vollständige Kopien des *roIC*-Gens aufweisen, während W2-9 zwar zwei T-DNA-Kopien, aber nur eine vollständige Kopie des *roIC*-Gens trägt.

Analyse der Transgen-Wiederholung („Transgen Repeats“) in Aspen

Eine Neuordnung von T-DNA's während der genetischen Transformation von Pflanzen können im Genom transgener Pflanzen in Form von Repeats erfolgen. Für die Untersuchung der Mechanismen zur Repeat-Bildung war es notwendig, zusätzlich zu den 35S-*roIC* transgenen Aspen weitere transgene Aspen, die mit anderen Konstrukten wie *rbcS-roIC*, *35S-iaaL*, *proIC-roIC*, *35S-uidA* und *35S-Ac-iaaL* transformiert wurden, zu untersuchen. Insgesamt wurden 45 transgene Aspen mit Hilfe der rpPCR untersucht, von denen 11 (=21%) das Vorliegen eines direkten (10 Linien) oder invertierten Repeats (1 Linie) zeigten.

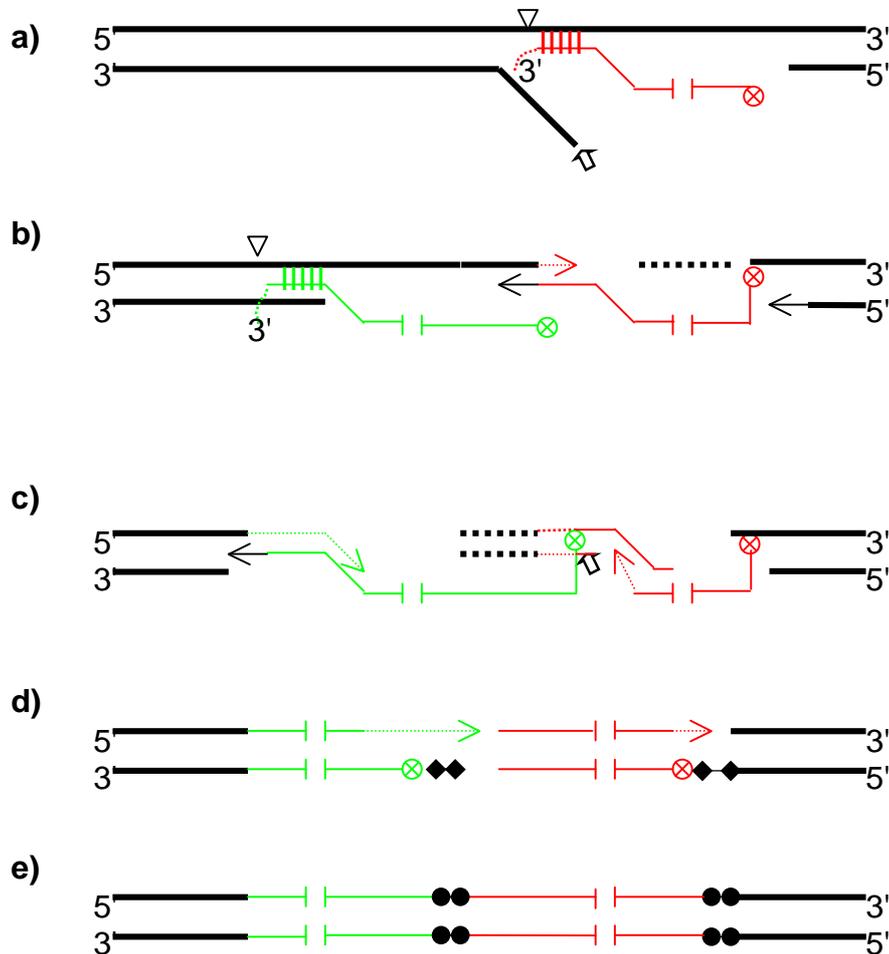
Die Sequenzierung der Verbindungen zwischen den beiden T-DNA-Kopien eines Repeats ergab, dass alle 10 direkten Repeats eine identische rechte „Border“ mit den Nukleotiden TGA aufweisen, während das invertierte Repeat der einen Linie eine abweichende Sequenz der rechten Border zeigte (Abb. 15). Die Ausbildung „präziser“ Verbindungen auf der Basis kurzer Regionen mit Sequenzhomologien zwischen den rekombinierenden Enden wurde in 3 transgenen Linien gefunden. In den anderen 8 Linien, in denen keine Sequenzhomologien zwischen rekombinierenden Enden gefunden wurden, fanden sich Füllsequenzen oder sogenannte „Filler-DNA“. Die Länge der Filler-DNA variierte zwischen 4 bis nahezu 300 Nukleotide. Die kurzen, bis 10 oder 12 Basenpaar langen Filler-DNA Sequenzen wurden von der T-DNA in der Nähe des Strangbruchs kopiert, während die langen Filler-Sequenzen Wirts-DNA unbekannter Herkunft darstellen.

Abb. 15: Sequenzen der Transgen-Repeat Verbindungen in verschiedenen transgenen Aspenlinien (Details s. Kumar und Fladung 2000b).



Aus den Ergebnissen wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Bildung der Transgen-Repeats durch eine simultane Invasion von zwei unabhängigen T-DNA-Strängen an einen „Empfänger-Hotspot“ erfolgt. Daraus wurde ein mechanistisches Modell für die T-DNA-Repeat- und Filler-Bildung in Aspen entwickelt (Abb. 16).

Abb. 16: Schematisches Diagramm über den Mechanismus der T-DNA-Integration und T-DNA-Repeat-Bildung (Details s. Kumar und Fladung 2000b).



Schlussfolgerungen und Ausblick

Für die Beurteilung von gentechnisch veränderten Bäumen hinsichtlich einer stabilen Expression der übertragenen fremden Gene ist es zunächst wichtig, Kriterien für „Stabilität“ bzw. „Instabilität“ zu erarbeiten. Die in diesem Forschungsbericht beschriebenen Ergebnisse an 35S-*rolC* transgenen Aspen, die während des Projektzeitraums von 5 bis 6 Jahren sowohl in der *in-vitro* Kultur und im Gewächshaus als auch unter Feldbedingungen gewonnen wurden, haben gezeigt, dass das Vorhandensein von T-DNA-Repeats als eine Ursache für die Instabilität des *rolC*-Gens anzusehen ist, was an den 35S-*rolC* transgenen Pflanzen phänotypisch als Reversion zu erkennen ist. Allerdings haben die Ergebnisse auch gezeigt, dass zum

einem verschiedene Typen von Reversion existieren, denen zum anderen verschieden-strukturierte Transgen-Integrationsorte gegenüberstehen. Die Ergebnisse, die nach Southern-, Northern- oder Western-Blot erhalten werden, lassen sich nicht immer mit denen aus PCR-Analysen in Einklang bringen. Zusammenfassend kann jedoch vermutet werden, dass die beobachtete Methylierung des 35S-Promotors als eine Konsequenz der Repeat-Bildung am jeweiligen Transgen-Integrationsort anzusehen ist.

An weiteren 35S-*roIC* sowie mit anderen Genkonstrukten transformierten Zitterpappeln, die nicht Bestandteil des Freisetzungsexperiments sind, konnte die rpPCR erfolgreich angewendet werden. Somit ist es mit der rpPCR-Methode möglich, Repeats einfach und sicher zu detektieren. Aus einer großen Anzahl unabhängiger transgener Linien können leicht diejenigen identifiziert werden, in denen ein Repeat vorliegt. Auch konnte ein Modell formuliert werden, was auf molekularer Ebene einen möglichen Mechanismus der Repeat-Entstehung in transgenen Zitterpappeln beschreibt. Schließlich ist es wichtig, die Wirkung von strukturellen Besonderheiten in flankierenden Regionen wie AT-reiche Bereiche oder andere Nukleotid-Wiederholungen auf die Expression des Transgens zu untersuchen.

Weiterhin ist festzustellen, dass Ergebnisse zur Genstabilität aus der *in-vitro* Kultur oder aus dem Gewächshaus nicht immer *per-se* auf Feldbedingungen übertragbar sind. Dieser Umstand macht deutlich, dass Untersuchungen unter Freilandbedingungen für eine umfassende Risikobewertung zu mindestens für transgene Bäume unerlässlich sind.

Schließlich kann es passieren, dass Ergebnisse, die aus einzelnen molekularen Untersuchungen wie Southern-Blot oder PCR-Analysen erhalten werden, die tatsächliche Situation der Transgen-Integration hinsichtlich Kopienzahl und/oder Organisation am Integrationsort nur unzureichend darstellen. Daher ist es notwendig, dass eine molekulare Analyse der transgenen Pflanzen unter Zuhilfenahme verschiedener molekularer Methoden betrieben wird.

Die aus diesem Forschungsprojekt erhaltenen Ergebnisse haben zu weitreichenden Erkenntnissen zur Übertragung von fremden Genen und deren stabilen Integration in Bäumen geführt. Es wurde gefunden, dass fremde Gene in Bäumen nicht immer stabil sind. Dennoch kann auch bei Bäumen davon ausgegangen werden, dass transgene Linien erzeugt werden können, die die fremden Gene stabil exprimieren. In diesem

Umfeld gilt es Bedingungen dafür zu entwickeln, die es erlauben, eine mögliche Instabilität von fremden Genen in Bäumen vorherzusagen. Eine interessante Frage schließlich ist, ob es überhaupt möglich ist, transgene Bäume zu erzeugen, die über ihren gesamten Lebenszyklus als „stabil“ einzustufen sind. Diese Frage wird im Zusammenhang mit der zielgerichteten Übertragung von fremden Genen in Genombereiche zu diskutieren sein, die, wenn es sie gibt, die Integration von Fremd-DNA akzeptieren.

Literatur

- Fladung, M. (1998) Transgene Bäume - Perspektiven und Grenzen. *Biologie in unserer Zeit* 28, 201-213.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1996) Gene transfer in aspen. In: Schmidt, E.R., Hankeln, T. (eds.), *Transgenic Organisms and Biosafety, Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA and Expression of Transgenes*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 275-281.
- Fladung, M., Muhs, H.J., Ahuja, M.R. (1996) Morphological changes observed in transgenic *Populus* carrying the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Silvae Genetica* 45, 349-354.

Dissemination

Die Ergebnisse, die in diesem Abschlußbericht beschrieben sind, wurden teilweise in Journals oder Büchern veröffentlicht sowie im Rahmen verschiedener Tagungen in Form von Vorträgen oder Postern präsentiert (siehe nachfolgende Auflistung). Während der Projektlaufzeit fanden einige sehr wichtige Tagungen in Deutschland und im europäischen Ausland statt, die Molekularbiologie und Gentechnik sowohl bei krautigen Pflanzen als auch bei Bäumen zum Thema hatten. Es war jeweils für das weitere Vorgehen im Projekt sehr wichtig, auf diesen Tagungen die bisher aus diesem Projekt erhaltenen Ergebnisse in Vorträgen und Postern vorzustellen und mit renommierten Kollegen zu diskutieren.

Veröffentlichungen nach Reviewverfahren:

- Fladung, M. (1998) Transgene Bäume - Perspektiven und Grenzen. *Biologie in unserer Zeit* 28, 201-213.
- Fladung, M. (1999) Gene stability in transgenic aspen-*Populus*. I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Mol. Gen. Genet.* 260, 574-581.
- Fladung, M. (2000) Aufbruch durch Gentechnik. *Wochenblatt für Papierfabrikation*, Frankfurt am Main 128 (5), 248-250.
- Fladung, M., Kumar, S. (2002) Gene stability in transgenic aspen-*Populus* – III. T-DNA repeats influence transgene expression differentially among different transgenic lines. *Plant Biol.*, in press.
- Grünwald, C., Deutsch, F., Eckstein, D., Fladung, M. (2000) Wood formation in *rolC* transgenic trees. *Trees*, 14, 297-304.
- Grünwald, C., Ruel K., Fladung M. (2001) Morphology, wood structure and cell wall chemistry of *rolC* transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15, 503-517.
- Kaldorf, M. Fladung, M., Muhs, H.J., Buscot, F. (2002) Mycorrhizal colonization of transgenic aspen in a field trial. *Planta* 214, 653-660.
- Kumar, S.; Fladung, M. (2000a) Determination of transgene repeat formation and promoter methylation in transgenic plants. *BioTechniques*, Natick/USA 28, 6, S. 1128-1137.
- Kumar, S.; Fladung, M. (2000b) Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Molecular and General Genetics Berlin* 264, S. 20-28.
- Kumar, S. Fladung, M. (2000c) Transgene repeats in aspen: molecular characterisation suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Molecular and General Genetics Berlin* 264, 20-28.
- Kumar, S., Fladung, M. (2001a) Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta* 213, 731-740.
- Kumar, S., Fladung, M. (2001b) Controlling transgene integration in plants. *Trends in Plant Science* 6, 155-159.
- Parani, M., Lakshmi, M., Ziegenhagen, B., Fladung, M., Senthilkumar, P., Parida, A. (2000) Molecular Phylogeny of Mangroves VII. PCR-RFLP of *trnS-psbC* and *rbcL* gene regions in 24 mangrove and mangrove associate species. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 454-460.

Veröffentlichungen ohne Reviewverfahren:

- Fladung, M. (1998) Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 43, 124-133.
- Fladung, M. (1999) Prospects for the isolation of genes controlling tree-specific traits by using a transposon tagging approach. In: *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Altman, A.; Ziv, M.; Izhar, S. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, S. 139-142.
- Fladung, M. (2000) Transgenic trees for a better world? In: *Proc. of the Intern. Congress "Application of Biotechnology to Forest Genetics" (Biofor-99)*, 22.-25. September 1999, Hrg. S. Espinel; E. Ritter, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2000, S. 339-345.
- Fladung, M. Ahuja, M.R. (1998) Genetic engineering of aspen using several gene constructs. In: *El Bassam, N., Behl, R.K., Prochnow, B. (eds.), Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry*. James & James (Science Publishers) Ltd, 118-122.

- Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M.R. (1999). Transposition of the maize transposable element Ac in transgenic aspen and its usability as a gene tagging system. In: A. Jamieson (Ed.): Proc. Second International Wood Biotechnology Symposium, Canberra, March 10-12, 1997, North Forest Products Limited, Ridgely, Australia, 1999, S. 125-135.
- Fladung, M., Muhs, H.-J. (1999). Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen. In: J. Schiemann (Ed.) Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. Proc. Zum BMBF-Workshop 25.-26. Mai 1998. Druck und Papier Meyer GmbH, Scheinfeld, 1999, S. 91-100.
- Fladung, M.; Gieffers, W.; Muhs, H.-J. (2000) Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus in *rolC*-transgenen Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) und deren Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften. In: Biologische Sicherheitsforschung bei Freilandversuchen mit transgenen Organismen und anbaubegleitendes Monitoring, Hrsg. J. Schiemann. Proc. zum BMBF-Statusseminar am 29. und 30. Juni 1999, Braunschweig, Maul Druck Verlag, Braunschweig, S. 37-42.
- Fladung, M.; Kaldorf, M.; Buscot, F.; Muhs, H.-J. (2000) Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen. In: Biologische Sicherheitsforschung bei Freilandversuchen mit transgenen Organismen und anbaubegleitendes Monitoring, Hrsg. J. Schiemann. Proc. zum BMBF-Statusseminar 29. und 30. Juni 1999, Braunschweig, Maul Druck Verlag, Braunschweig, S. 77-83.
- Fladung, M.; Muhs, H.-J. (1999) Freisetzungsversuch mit *Populus tremula* (*rolC*-Gen) in Großhansdorf. In: „Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven“, Tagungsband zum Fachgespräch am 20. und 21.9.1999, Humboldt-Universität zu Berlin = Texte 99, Umweltbundesamt, Berlin, S. 45-50.
- Fladung, M.; Muhs, H.J.: Transgene Bäume in Schleswig-Holstein. In: Biotechnologie. Oesser, M.; Jacobs, H.; Kubbutat, K. (Eds.), Schmidt Römhild, Lübeck, (1999), S. 24-26.
- Fladung, M.; Tusch, A.; Markussen, T.; Ziegenhagen, B. (2000) Analysis of morphological mutants in *Picea*. In: Proc. of the Intern. Congress "Applications of biotechnology to forest genetics" (Biofor 99), Vitoria-Gasteiz, 22.-25. September 1999, Hrsg. S. Espinel; E. Ritter, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2000, S. 167-170.
- Gieffers, W.; Fladung, M. (1999) Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. In: „Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven“, Tagungsband zum Fachgespräch am 20. und 21.9.1999, Humboldt-Universität zu Berlin = Texte 99, Umweltbundesamt, Berlin, S. 92-97
- Grünwald, C., Fladung, M. (2000) Molekulare Regulation der Holzbildung – Sind Holz- und Fasereigenschaften genetisch modifizierbar?-. In: Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Nr. 200, Kommissionsverlag Hamburg, 69-76.
- Kaldorf, M.; Fladung, M.; Muhs, H.-J.; Buscot, F. (1999) Interaktionen zwischen Mykorrhizapilzen und transgenen Bäumen. In: „Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven“, Tagungsband zum Fachgespräch am 20. und 21.9.1999, Humboldt-Universität zu Berlin, = Texte 99 Umweltbundesamt, Berlin, S. 86-91.
- Kumar, S.; Fladung, M. (2000) Molecular analyses of stable and unstable transgenic aspen-*Populus* lines. In: Proc. of the Intern. Congress "Applications of biotechnology to forest genetics" (Biofor 99), Vitoria-Gasteiz, 22.-25. September 1999, Hrsg. S. Espinel; E. Ritter, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2000, S. 387-395.

- Kumar, S.; Fladung, M. (2000) Molecular characterization of stable and unstable transgenic aspen (*Populus*). In: Biotechnology 2000, The World Congress on Biotechnology, 3-8 September 2000, Berlin, Vol. 3, 2000, S. 194-196.
- Markussen, T.; Tusch, A.; Stephan, B.R.; Fladung, M. (2000) QTL mapping of selected wood properties in Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. In: Proc. of the Intern. Congress "Applications of biotechnology to forest genetics" (Biofor 99), Vitoria-Gasteiz, 22.-25. September 1999, Hrsg. S. Espinel; E. Ritter, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2000, S.157-159.

Vorträge und Vortragsabstracts

- Deutsch, F.; Fladung, M.; Kumlehn, J.: Embryogenese von isolierten Mikrosporen einer Schwarzpappelhybride. Forschungsseminar 2001, Fachbereich Biologie der Universität, in Hamburg, 4. und 5.7.2001.
- Deutsch, F.; Kumlehn, J.; Fladung, M.: Etablierung einer Mikrosporenkultur bei Pappeln: besteht die Möglichkeit einer Transformation vor der Diploidisierung? Meeting der Deutschen Sektion der IAPTC in Bonn, 13.7.2001.
- Deutsch, F.; Fladung, M.: Versuche zur Erzeugung haploider Pappeln. Tagung der deutschen Sektion der IAPTC, Bonn, 6.10.2000.
- Fladung, M. Aufbruch durch Gentechnik. APV-Jahrestreffen 1999, in Darmstadt am 29. und 30.10.1999.
- Fladung, M. Bäume und Gentechnik. 5. Sitzung des APV-Arbeitskreises "Rationelle Nutzung nachwachsender Rohstoffe", bei Stora Kabel, Hagen, vom 24.-25.3.1999. 25.3.1999.
- Fladung, M. Bio- und Gentechnik für die Züchtung von Gehölzen. Kolloquium des Instituts für Botanik, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 23.11.1998.
- Fladung, M. Bio- und gentechnologische Methoden für die Züchtung von Gehölzen - Chancen und Risiken. Gemeinsames Treffen der AG Zierpflanzen und AG Gehölze der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Ahrensburg, 18.-19.5.1998.
- Fladung, M. Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. 4. Tagung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Gießen, 3.-5.3.1998.
- Fladung, M. Hilft die Gentechnik der Forstpflanzenzüchtung? 24. Internationale Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung: "Nachhaltige Nutzung forstgenetischer Ressourcen". Pirna, 14. bis 16.03.2000.
- Fladung, M. Kumar, S. Methylation pattern and flanking DNA sequences in transgenic aspen-*Populus* lines in relation to stable or unstable transgene expression. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.
- Fladung, M. Möglichkeiten und Grenzen der Gentechnik in der Forstwirtschaft. Holzchemisches Kolloquium am Institut für Holzchemie der BFH, Hamburg, am 06.05.1999.
- Fladung, M. Prospects for the isolation of genes controlling tree-specific traits by using a transposon tagging approach. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel, 14.-19.6.1998.
- Fladung, M. Transgene Bäume – Perspektiven und Grenzen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Tage im Landesinstitut für Schule, in Bremen am 3.2.1999.
- Fladung, M. Transgenic trees for a better world? Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M. Wie stabil sind fremde Gene in Waldbäumen. Pflanzengenetisches Kolloquium im Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen, 24.11.1998.

- Fladung, M., Kumar, S.: Die Stabilität fremder Gene in transgenen Bäumen ist abhängig von der Art der Integration der Konstrukte in das Genom. Botaniker-Tagung 2000, Jena, 20.9.2000.
- Fladung, M., Kumar, S.: Transgenic trees: From tree improvement to functional genomics. 10th International Meeting of the IUFRO Working Party on Molecular Biology of Forest Trees "Tree Biotechnology in the New Millenium", in Stevenson, Washington/USA vom 22. bis 27.7.2001.
- Fladung, M., Muhs, H.-J. Freisetzungsversuch mit *Populus tremula* (*rolC*-Gen) in Großhansdorf. Fachgespräch "Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven", in Berlin am 20. und 21.9.1999.
- Fladung, M., Muhs, H.-J. Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen unter Freilandbedingungen. BMBF-Workshop 'Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen', Braunschweig 25.-26.5.1998.
- Fladung, M.: Aus dem Labor auf das Feld: Erfahrungen aus einem Freilandversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen. Jährliches Treffen der Deutschen Gesellschaft für Ökologie, Kiel, 12.9.2000.
- Fladung, M.: GABI-POP: Isolation of tree specific genes and promoters in poplar. 1. Statusseminar zur Pflanzengenomforschung GABI, Bonn am 20. und 21.2.2001.
- Fladung, M.: Genetische Modifizierung von Organismen. Sitzung des Verbands Deutscher Papierfabriken, Arbeitskreis Zellstoffverbraucher, in Baden-Baden am 27.6.2000.
- Fladung, M.: Gentechnik in der Forstwirtschaft: Verein der Deutschen Papierfabriken, Axel-Springer-Haus, in Berlin am 22.11.2001.
- Fladung, M.; Gieffers, W.; Muhs, H.-J.: Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus in *rolC* transgenen Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) und deren mögliche Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften. Braunschweig, 29.6.1999 (*Vortragender).
- Fladung, M.; Kaldorf, M.; Buscot, F.; Muhs, H.-J.: Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Zitterpappeln. Braunschweig, 29.6.1999 (*Vortragender).
- Fladung, M.; Kumar, S.; Kaldorf, M.; Grünwald, C.; Deutsch, F.; Muhs, H.-J.: Integration und Expression von fremden Genen in Zitterpappeln. 14. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen vom 28.2. bis 3.3.2001.
- Fladung, M.; Nowitzki, O.; Kumar, S.: Transgenic aspen: transgene integration, stable expression, and functional genomics. Internationale Konferenz "Wood, Breeding, Biotechnology and industrial expectations. Bordeaux/Frankreich, 11. bis 14.6.2001.
- Gieffers, W., Fladung, M. Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Fachgespräch "Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven", in Berlin am 20. und 21.9.1999.
- Grünwald, C., Schmitt, U., Deutsch, F., Fladung, M., Eckstein, D. Wood structure and cell wall architecture in *RolC* transgenic aspen trees. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.
- Kaldorf, M., Fladung, M., Muhs, H.-J., Buscot, F. Interaktionen zwischen Mykorrhizapilzen und transgenen Bäumen. Fachgespräch "Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven", in Berlin am 20. und 21.9.1999.
- Kumar, S., Fladung, M. Molecular analyses of stable and unstable transgenic aspen-*Populus* lines. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Kumar, S.; Fladung M.: Transgene integration, stable expression and gene targeting in aspen. 10th International Meeting of the IUFRO Working Party on Molecular Biology of Forest Trees "Tree Biotechnology in the New Millenium", in Stevenson, Washington/USA vom 22. bis 27.7.2001.

Posterpräsentationen

- Deutsch, F.; Muhs, H. J.; Fladung, M.: Ausbildung von Blütenknospen bei *rolC*-transgenen Zitterpappeln unter Freilandbedingungen. Botaniker-Tagung 2000, Jena, 19. bis 21.9.2000. Poster
- Fladung, M. Das *Ac*-Transposon aus Mais springt auch in Bäumen. In: Tagungsprogramm und Abstracts, Botaniker-Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen, 30.8.-6.9.1998.
- Fladung, M. Molekulare Analyse des Integrationsortes von fremden Genen in Bäumen bei stabil und instabil exprimierenden Transformanten. In: Tagungsprogramm und Abstracts, Botaniker-Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen, 30.8.-6.9.1998.
- Fladung, M. Stabilität von Transgenen in Pappeln – Flankierende Regionen und T-DNA Struktur. 12. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, in Dabringhausen vom 3.3. bis 6.3.1999.
- Fladung, M. The *Ac*-transposon from maize is also active in trees. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.
- Fladung, M. The *Ac*-transposon from maize is also active in trees. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M. Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene und zur Transposition von *Ac* in Aspen-*Populus*. 11. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 4. - 7.3.1998.
- Fladung, M., Kaldorf, M., Muhs, H.-J., Buscot, F. Mykorrhizal status of transgenic *Populus* in a field trial. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.
- Fladung, M., Kaldorf, M., Muhs, H.-J., Buscot, F. Mykorrhizal status of transgenic *Populus* in a field trial. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M., Kumar, S. What is needed for stable expression of foreign genes in trees? Jährliches Treffen der Deutschen Gesellschaft für Genetik, München-Neuherberg, 4.-7.10.1999.
- Fladung, M., Kumar, S., Kaldorf, M., Gieffers, W., Buscot, F., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. MCC-2000 – Mendel Centenary Congress", Brno/Tschechien, 7. bis 9. 3.2000.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ebbinghaus, D., Schellhorn, A., Bentien, G., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ebbinghaus, D., Schellhorn, A., Bentien, G., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M., Tusch, A., Markussen, T., Ziegenhagen, B. Analysis of morphological mutants in *Picea*. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M., Tusch, A., Markussen, T., Ziegenhagen, B. Analysis of morphological mutants in *Picea*. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M., Tusch, A., Markussen, T., Ziegenhagen, B. Analysis of morphological mutants in *Picea*. Jährliches Treffen der Deutschen Gesellschaft für Genetik, München-Neuherberg, 4.-7.10.1999.
- Fladung, M.; Deutsch, F.; Kumar, S.: GABI-POP: Isolation of tree-specific genes and promoters by a

- transposon-tagging approach. 10th International Meeting of the IUFRO Working Party on Molecular Biology of Forest Trees "Tree Biotechnology in the New Millennium", in Stevenson, Washington/USA vom 22. bis 27.7.2001.
- Fladung, M.; Kumar, S.: The *Ac*-transposon from maize transposes in trees. Plant and animal genome IX meeting, in San Diego/USA, vom 13. bis 17.1.2001.
- Fladung, M.; Tusch, A.; Markussen, T.; Ziegenhagen, B.: Analysis of morphological mutants in *Picea*. MCC-2000 – Mendel Centenary Congress", Brno/Tschechien, 7. bis 9. 3.2000.
- Grünwald, C., Schmitt, U., Deutsch, F., Eckstein, D., Fladung, M. 35S-*rolC* transgenic aspen – a useful system for in vivo wood formation research. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Kaldorf, M., Fladung, M., Muhs, H.-J., Buscot, F. Interaktionen zwischen Mykorrhizapilzen und transgenen Aspen. VAAM-Workshop Molekularbiologie der Pilze, Marburg, 30.9.-3.10.1999.
- Kaldorf, M., Fladung, M., Muhs, H.-J., Buscot, F.: Mykorrhizierung transgener Aspen im Freiland. Botaniker-Tagung 2000, Jena, 19. bis 21.9.2000.
- Kumar, S.; Fladung, M.: Molecular characterization of stable and unstable transgenic aspen (*Populus*). Biotechnology 2000. The World Congress on Biotechnology, Berlin, 3. bis 8.9.2000.
- Kumar, S.; Fladung, M.: Transgene integration in aspen: mapping of the integrated T-DNAs and genomic target sites. Plant and animal genome IX meeting, in San Diego/USA, vom 13. bis 17.1.2001.
- Markussen, T.; Tusch, A.; Stephan, B. R. und Fladung, M.: Identifizierung molekularer Marker für selektierte Holzeigenschaften der Fichte *Picea abies* (L.) Karst. Botaniker-Tagung 2000, Jena, 19. bis 21.9.2000.
- Markussen, T.; Tusch, A.; Stephan, B. R.; Fladung, M.: Molekularer Marker für definierte Holzeigenschaften der Fichte *Picea abies* (L.) Karst. 8. Tagung der AG Molekulare Marker, Kiel, 28. und 29. 9.2000.
- Markussen, T.; Wrobel, S.; Fladung, M.: Erstellung einer ultrahoch gesättigten Genkarte für die Seestrandkiefer *Pinus pinaster*. 8. Tagung der AG Molekulare Marker, Kiel 28. und 29.9.2000.
- Paasch, S.; Fladung, M.; Ziegenhagen, B.: Entwicklung von DNA Markern zur Geschlechtsbestimmung bei der Aspe. 9. Arbeitstagung der AG 4 'Molekulare Marker' der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V., in Halle am 25. und 26.9.2001.